

DK 573705

THE 262

UNIVERSITE DE PARIS XI - ORSAY

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

- PHYTOPATHOLOGIE -

1982 - 1983

G . E . R . D . A . T .

LABORATOIRE DE PHYTOBACTERIOLOGIE

MONTPELLIER

ESSAI DE CARACTÉRISATION DE SOUCHES DE P. SOLANACEARUM E. F. SMITH
ISOLÉES DES ÎLES DE LA RÉUNION, DE GRENADÉ ET D'HAÏTI.

Marie-Christine ESCALANT-TAUZIET

REMERCIEMENTS

Ce stage a été réalisé au G.E.R.D.A.T., au laboratoire de Phytobactériologie de Montpellier, sous la direction de Monsieur Pierre FROSSARD.

Je tiens à remercier :

Monsieur R. HUET, Président du Conseil du Centre du G.E.R.D.A.T., pour m'avoir accueillie dans son établissement ;

Monsieur P. FROSSARD, Directeur de Recherches, pour ses conseils et l'aide constante qu'il m'a apportés ;

Mademoiselle C. de VALLAVIEILLE, Chargée de Recherches au C.N.R.S., ainsi que son équipe, pour leur appui tant matériel que moral ;

Monsieur P. ROTT, Stagiaire à l'I.R.A.T., pour son amical soutien et tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, en particulier Mesdames CASSAR et BERTRAND qui en ont assuré la dactylographie.

RESUME

L'étude des caractéristiques biochimiques et physiologiques d'un groupe de 18 isolats de *P. solanacearum* E. F. Smith a permis de confirmer leur appartenance à l'espèce ainsi que leur séparation en 4 biovars.

L'étude comparée de leurs propriétés sérologiques n'a pu établir l'existence de sérotypes.

L'étude de leurs relations vis-à-vis d'un ensemble d'antibiotiques démontre l'existence d'une probable corrélation entre les biovars et la sensibilité à l'Oléandomycine (15 µg/ml) et à la Bacitracine (10 µg/ml).

L'étude de leur pouvoir pathogène par infiltration de feuilles de *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN fait apparaître parmi ces souches 3 pathovars correspondant aux races 1, 2 et 3. Le même test effectué sur cotylédons de *Gossypium sp.* permet de distinguer les races 1 et 3 de la race 2.

L'étude de leur pouvoir pathogène sur une gamme d'hôtes : *Solanum tuberosum* L. cv. Sterling, *Lycopersicum esculentum* Mill. cv. merveille des marchés et hybride de 1^{re} génération java, *Solanum melongena* L. cv. violette longue hative, *Capsicum annuum* L. cv. carré doux extra hâtif, a permis de retrouver *in vivo* les symptômes du flétrissement bactérien dû à *P. solanacearum* E. F. Smith et d'esquisser une possible partition des isolats, découlant de l'homogénéité de ce pouvoir en fonction de l'hôte d'origine des souches.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

INTRODUCTION

Présentation du flétrissement bactérien

But du travail

1 - GENERALITES

11 - Répartition géographique de *P. solanacearum*

12 - Symptômes

13 - Classification

14 - Caractéristiques de *P. solanacearum*

2 - MATERIELS ET METHODES

21 - Isolement, sélection, culture et conservation des souches

22 - Caractérisation du phénotype

23 - Sérologie

24 - Antibiotiques

25 - Recherche de bactériophages

26 - Tests Tabac - Cotonnier

27 - Tests d'inoculation artificielle

3 - RESULTATS

31 - Caractères culturels

32 - Caractères physiologiques et biochimiques - Biovars

33 - Caractères sérologiques

34 - Relations vis-à-vis des antibiotiques

35 - Bactériophages

36 - Caractères en relation avec les tests Tabac - Cotonnier - Pathovars

37 - Caractères en relation avec la "gamme" d'hôte.

4 - CONCLUSIONS

5 - ANNEXES

Milieux

Tableaux

Planches

Références bibliographiques.

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	: Anticorps
Ag	: Antigène
ALMT	: Milieu Ayers - Lactate - Malonate - Tryptophane
L- ALA	: Milieu à L-phényl alanine
ARG DH	: Arginine dihydrolase et milieu
As	: Antisérum
A 30	: Auréomycine à 30 µg/ml
Au	: Aubergine
Ba	: Bananier
B 10	: Bacitracine à 10 µg/ml
C 30	: Chloramphénicol à 30 µg/ml
C.S.	: Milieu Citrate de Simmons
CX	: Cellulase et milieu
Ge	: Géranium
HdA, B, C	: Milieux d'Hildebrand A, B, C
HL	: Milieu de Hugh-Leifson
KING B	: Milieu de KING B
K 30	: Kanamycine à 30 µg/ml
LDC	: Lysine décarboxylase et milieu de Taylor
L2	: Lincomycine à 2 µg/ml
L-LYS	: L-Lysine et milieu de Möller
M	: Colonie "hyper Mucous"
MH	: Milieu de Muller-Hinton
Mö1	: Milieu de Möller
NaCl 0,5 ; 1 ; 2	: Milieux à 0,5 ; 1 ; 2 % de NaCl
ODC	: Ornithine décarboxylase et milieu de Taylor
OL	: Oléandomycine à 15 µg/ml
L-ORN	: L-Ornithine et milieu de Möller
PBOH B	: Polyβ hydroxybutyrate et milieu
P 10	: Pénicilline G à 10 µg/ml
Pd	: Pomme de terre
PG	: Polygalacturonase
PME	: Pectine méthyl estérase
PO	: Poivron
R	: Colonie "rough"
S	: Colonie "smooth"
TDA	: Tryptophane désaminase
Te.30	: Tetracycline à 30 µg/ml
TO.F1	: Tomate hybride de 1e génération
TO	: tomate
TTC +	: Milieu de Kelman
TRP	: Tryptophane
TWE	: Tween extérase et milieu
TYR	: Tyrosinase et milieu
URE C	: Uréase et milieu de Christensen
URE D	: Uréase et milieu de Dye
URE F	: Uréase et milieu de Ferguson
Va 30	: Vancomycine à 30 µg/ml

INTRODUCTION

Le flétrissement bactérien causé par *P. solanacearum* E.F. Smith (1896) est répandu dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées-chaudes. La bactérie a une longue histoire de dégâts causés à la production de plantes cultivées économiquement importantes : *Nicotiana tabacum* L., *Lycopersicum esculentum* Mill., *Capsicum annum* L., *Solanum melongena* L., *Arachis hypogea* L., *Solanum tuberosum* L., *Musa* sp. Le continent d'origine de la maladie est inconnu (28).

La bactérie, transmise par le sol (7), est très difficile à éliminer car sa survie y est indéfinie dans la plupart des cas même si une possibilité de rotation à court terme existe pour certains pathovars (7).

La lutte chimique et par antibiotiques est souvent impraticable. Sa gamme d'hôtes étendue et sa distribution géographique mondiale rendent difficiles la détermination de pratiques culturales efficaces et une bonne exploitation du sol (45). Car la transmission de la maladie se fait par transport de plants infectés ; par travail de sols infectés avec des outils contaminés ; par irrigation ; par hôtes intermédiaires : insectes (souche SFR) (6) et nématodes (45).

Du point de vue de la lutte génétique, la sélection de la résistance a été un succès sur tabac en Caroline du Nord et sur arachide en Indonésie. Les études se poursuivent sur tomate et pomme de terre (70). Cependant, une résistance en un lieu donné peut s'effondrer dans une région différente en présence de la virulence correspondante ou ne plus s'exprimer dans certaines conditions de milieu (19, 72, 73). De plus, la génétique de la transmission de la résistance reste encore à modéliser pour les hôtes majeurs (3).

Aucune autre maladie bactérienne ne cause plus de pertes, ce qui rend l'étude de *P. solanacearum* toujours d'actualité sur le plan taxonomique (18-62).

Il a donc paru intéressant d'étudier sous tous les angles possibles une petite collection de souches isolées des îles de la Réunion, de Grenade et d'Haïti (Tableau I).

Les souches isolées de pomme de terre à la Réunion ont-elles des caractéristiques propres permettant de les différencier de souches isolées d'autres hôtes de l'île ?

Peut-on obtenir un sérum spécifique permettant le diagnostic au champ du flétrissement de la pomme de terre ? (demande de l'I.R.A.T.)

Peut-on répondre aux mêmes questions en ce qui concerne les souches isolées de bananier à Grenade ? Les souches d'Haïti ont été incluses pour élargir la comparaison.

Ces questions ont un but pratique évident : sélection sanitaire de plants de pomme de terre, possibilité de culture sur des parcelles précédemment cultivées en tomate, géranium rosat atteints par le flétrissement, caractérisation plus poussée des souches de Grenade.

Après avoir tenté de résumer l'ensemble des connaissances acquises sur la maladie et l'organisme pathogène qui ont guidé la mise en place de notre expérimentation, exposé les méthodes utilisées, nous essayerons de dégager des conclusions à partir des résultats obtenus.

1 - GENERALITES

11 - Répartition géographique (de *P. solanacearum*)

cf. carte ci-contre

La liste des pays hébergeant *P. solanacearum* est en annexe (annexes I et I bis).

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE

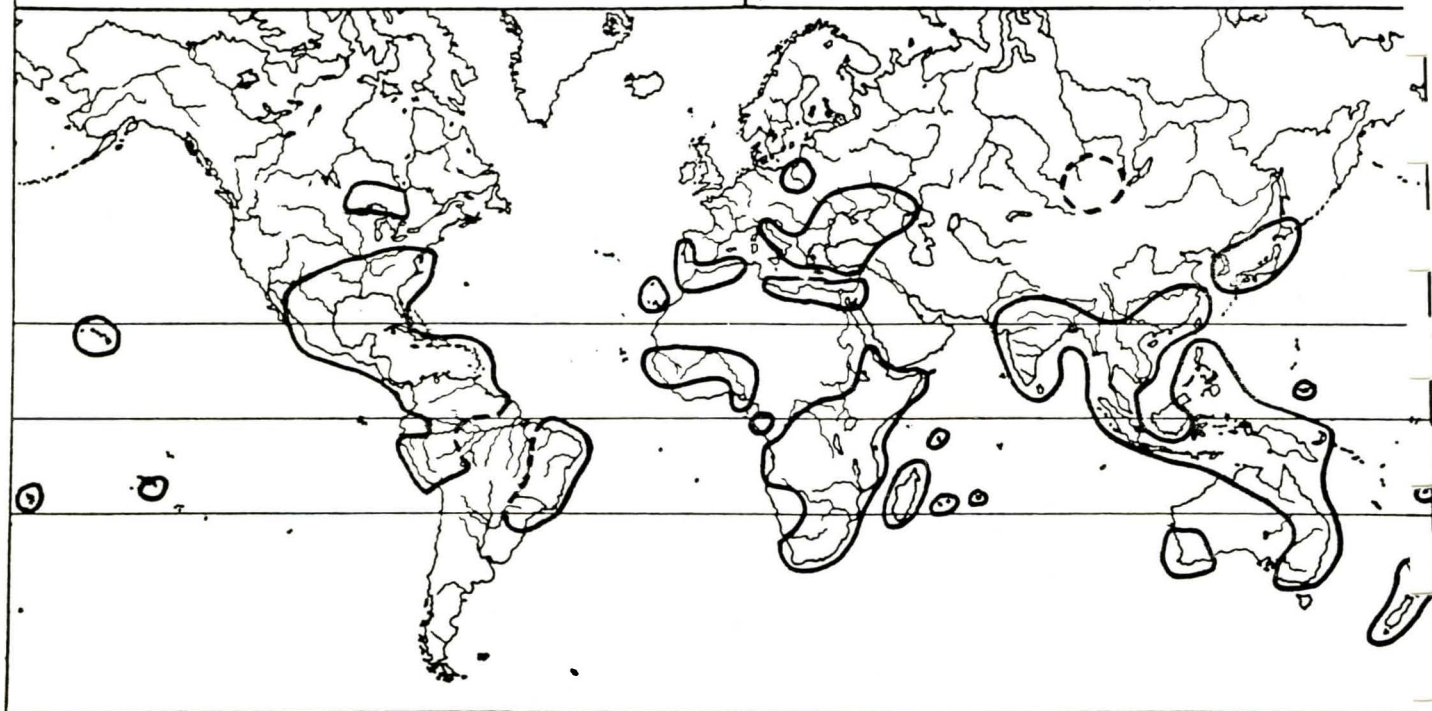
DISTRIBUTION MAPS OF PLANT DISEASES

Map No. 138 Edition 5

Issued 1.x. 1977

Pathogen: *Pseudomonas solanacearum*
(E.F. Smith) E.F. Smith

Hosts: Potato (*Solanum tuberosum*), tobacco
(*Nicotiana tabacum*) banana (*Musa*) etc.



© Commonwealth Agricultural Bureaux 1977

12 - Symptômes (d'une infection par *P. solanacearum*)

L'effet caractéristique est un flétrissement soudain dû à la perturbation de la circulation d'eau et des sels minéraux.

La production par la bactérie, *in vivo* et *in vitro*, d'éthylène, d'acide indolacétique (AIA), de mucus extrapolsaccharidique (E.P.S.) permet de comprendre le syndrome évolutif de la maladie : jaunissement des feuilles, épénastie foliaire, émission de racines adventives, flétrissement suivi de nécrose et de désorganisation des tissus en pourriture molle (7, 35, 65).

Les symptômes externes, au niveau de la feuille sont un flétrissement dû au blocage du mouvement de l'eau dans les vaisseaux et les trachéides par les corps bactériens, le mucus E.P.S., la thyllose végétale. Le jaunissement par altération de la chlorophylle est aussi une conséquence de ce blocage, ainsi que les nécroses marginales. L'épénastie est entraînée par l'augmentation des taux d'AIA, stimulant également l'apparition de racines adventives et par la production d'éthylène, responsable, par ailleurs, du jaunissement prématuré des fruits du bananier.

Les symptômes internes sont variés : coloration vasculaire brune provoquée par la tyrosinase bactérienne et les polyphénols oxydases végétales ; thyllose induite par l'augmentation des taux d'AIA comme le collapsus vasculaire et la prolifération parenchymateuse ; dissolution des composés pectiques de la lamelle moyenne par les PME et les PG ; dégradation de la cellulose par les cellulases (42). Ces enzymes pectinolytiques et cellulolytiques n'ont qu'un rôle secondaire de nutrition et de pénétration de la bactérie (36).

13 - Classification (de *P. solanacearum*)

La caractérisation et l'identification des souches sont une étape essentielle de l'étude du flétrissement bactérien. Problème complexe ; l'espèce n'étant pas uniforme, il existe plusieurs niveaux de classification subsppécifique.

Les souches isolées de lieux géographiques et de plantes différentes ont des propriétés bactériologiques, biochimiques, sérologiques, lysogéniques et bactériocinogéniques variables. OKABE et GOTO en 1961 (in 57) ont séparé différents isolats du Japon, en 40 groupes correspondants à 13 "pathotypes" déterminés par inoculations artificielles. Il n'y a pas de corrélation entre ces "pathotypes" et ceux déterminés par BUDDENHAGEN en 1962 et BUDDENHAGEN-KELMAN en 1964 (7) selon le rang hôte, dénommés races :

- 1 - Solanacées et autres dicotylédones
- 2 - Musacées
 - souches séparées par FRENCH-SEQUEIRA en 1970 (19)
 - B - Bananier (flétrissement)
 - D - Heliconia (épénastie et flétrissement léger)
 - Smooth Fluidal Round - transmises par insectes (SFR)
 - H - Plantain AAB
 - R - Heliconia (colonie très pigmentée)
- 3 - *Solanum tuberosum* L. d'altitude
- 4 - *Nicotiana tabacum* L.

Il peut exister ou non une spécificité d'hôte concomitante avec d'autres caractères. En particulier, la race 3 correspond à 1 des 4 biovars (II) déterminés par HAYWARD en 1964 (28). Mais le biovar II, s'il renferme tous les pathovars de race 3, en contient aussi beaucoup de race 1. De plus, on peut regrouper les biovars I - II et III - IV sur la base de l'électrophorèse comparée d'enzymes sélectifs (69).

Il est possible de subdiviser l'espèce en d'autres sous-groupes par des études sérologiques, lysotypiques (61). Toutes ces études contribuent à une meilleure connaissance des souches isolées (25, 46). Elles peuvent aider à surmonter les difficultés épidémiologiques en éclaircissant la distribution des populations (7).

14 - Caractéristiques de *P. solanacearum*

141 - bactériologiques, biochimiques et physiologiques

P. solanacearum appartient au groupe des *Pseudomonas* phytopathogènes gram -, aérobies stricts, de métabolisme oxydatif (34), cytochrome oxydase +, catalase + (15),

(2, 29, 47, 58, 60, 69).

Bacille asporogène, il est mobile par 1 à 4 flagelles polaires. Les isolats virulents sont souvent non flagellés et non mobiles contrairement aux avirulents (30, 43). Ce sont les fimbriae ou pili qui permettent alors la croissance sur milieu solide (21, 44).

Les cellules ne produisent pas de pigments fluorescents sur KING B (annexe II) mais des "pigments" bruns diffusibles sur TYR (annexe II) (5, 19, 28, 52). Les corps bactériens renferment sur milieu riche en sucre P β OHB (annexe II) des inclusions lipidiques colorables au noir Soudan B (27). Il y a davantage de poly β hydroxybutyrate et à un plus haut degré de polymérisation chez les souches virulentes (68, 28).

L'utilisation des hydrates de carbone est limitée (59) et varie avec les souches (30). Nitrate réductase +, quelques souches dénitrifient (25, 28, 59). L'optimum de température de croissance varie : 27 à 37° C, maximum 39° C, minimum 10 à 15° C (40). Le seuil de tolérance à NaCl est de 2 % (23, 28).

Toutes les souches mutent en culture d'une forme virulente (colonies muqueuses S ou fluides M) à une forme avirulente (colonies plus petites, cireuses R) (47, 11). Ceci est visualisé sur milieu à tétrachlorure de tétrazolium (24, 40, 49, 50) par des différences de coloration des colonies en relation avec l'existence (S), l'absence (R), la quantité (M) d'E.P.S. Cet exudat n'est pas organisé en capsule distincte mais constituerait une des protection de la bactérie contre les réactions de défense de l'hôte (11, 35, 42).

142 - sérologiques

P. solanacearum est une mosaïque d'Ag (planche IV) dont seuls certains prennent part à la relation Ag - Ac mais il y a une relation stricte entre espèce et sérotype. La relation est beaucoup plus aléatoire en ce qui concerne la spécificité de race ou de souche : des Ag O (17) ou des Ag polysidiques (49) hétérogènes peuvent être obtenus aussi bien que des Ag spécifiques de race (53, 54). DIGAT-CAMBRAL en 76 (16) démontrent que les E.P.S. et les Ag O de *P. solanacearum* sont étroitement liés sauf pour peu de souches et ne peuvent aider qu'à la différenciation de la bactérie d'autres *Pseudomonas* ; mais que les Ag glycoprotéiques sont plus spécifiques de race et de souche même si les relations sont moins claires et plus difficiles à établir.

143 - en relation avec les antibiotiques

Les antibiotiques ont surtout été utilisés dans des milieux destinés à isoler la bactérie de sols infectés : TTC + (annexe II) modifié (24), SM (39), FSM (55, 56) ou de plantes infectées : milieux de Jenkins-Morton-Dukes (37) ou de Jenkins-Kelman (38).

Cependant GRANADA-SEQUEIRA en 1975 (souches colombiennes) (2) et HAYWARD en 1976 (souches australiennes) (30) ont testé la sensibilité d'une souche à un ensemble d'antibiotiques. HAYWARD établit la relation suivante vis-à-vis de l'oléandomycine à 5 μ g/ml : biovar II Résistant, III Résistant ou Intermédiaire, IV Sensible.

144 - lysotypiques

La lysotypie, test spécifique, rencontre beaucoup de difficultés en pratique. Les phages de *P. solanacearum* sont souvent polyvirulents et ne peuvent servir qu'à la détermination de rapports bactériens et non à son identification.

OKABE-GOTO (62) montrent que l'isolement des phages, leur conservation en culture, leur longévité, difficiles, nuisent à leur utilisation (57). Ils ont cependant pu déterminer avec 12 phages tempérés et virulents 40 lysotypes et proposé une possible origine des 4 biovars par des phénomènes de transduction ou de conversion lysogénique.

145 - pathogéniques

Le classique test Tabac permet de différencier les 3 races par la réaction des feuilles à une infiltration (22, 51, 66). Les différences de symptômes correspondent à des différences de vitesse de croissance de la bactérie (67). Sur *Nicotiana tabacum* L. cv. Bottom spécial, la race 1 provoque une nécrose brun noir à halo chlorotique en 36 h (N) ou sans halo (N') avec flétrissement généralisé en 8 jours ; la race 2 une réaction d'hypersensibilité (HR) en 10 - 12 h sans systémisation ; la

race 3 une chlorose puis une décoloration (Y) en 48 h des seules zones infiltrées.

En ce qui concerne les relations hôte-parasite, on note que le phénomène de reconnaissance serait supporté par le système Lipo Poly Saccharides (LPS) - Lectines provoquant une réaction incompatible dont l'exacerbation est la réaction hypersensible. Lorsque le mucus E.P.S. est abondant, il y aurait inhibition efficace du système LPS -Lectines et donc réaction de compatibilité. SEQUEIRA en 1976 (67) souligne que la reconnaissance exige 3 composants ce qui peut expliquer le haut degré de spécificité d'hôte montré par certaines souches. Des modifications même légères, quantitatives ou qualitatives, d'un de ces composants peuvent déterminer la capacité d'une souche à pousser sur un hôte donné (1, 14, 19, 41, 46, 72).

2 - MATERIELS ET METHODES

21 - Isolement, sélection, culture et conservation des souches

Les souches, isolées au lieu d'origine (tableau I), parviennent au laboratoire en ampoules d'eau distillée. Une goutte de la suspension bactérienne (1/20 ml) est déposée à la pipette pasteur sur TTC + (annexe II) et étalée en 3 secteurs afin d'opérer un isolement des germes. L'incubation est faite à $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ de 24 à 48 h. Les mutants avirulents forment des colonies entièrement rouges et plus petites que les isolats virulents muqueux blancs à centre rouge-rosé (24, 40, 42, 59).

Les colonies virulentes sont prélevées et repiquées une deuxième fois sur TTC + pour constituer le clone bactérien pur qui sera étudié ultérieurement.

La culture des isolats est faite indifféremment sur LPGA, TTC - ou KING B (annexe II), le plus souvent sur TTC -.

La conservation des souches se fait à la température ambiante en suspension dense dans de l'eau distillée stérile pour les travaux à court terme. Les suspensions, dont la concentration en bact./ml est donnée graphiquement par la relation avec l'absorbance mesurée au colorimètre (planche V), sont congelées ou lyophilysées pour le moyen et le long termes.

22 - Caractérisation du phénotype

221 - morphologie

Coloration de Gram effectuée selon la méthode classique (22).

Mobilité examinée à l'état frais entre lame et lamelle, à partir d'une culture en milieu liquide EPN de 24 h (22) (annexe II), au microscope en contraste de phase,

Coloration des flagelles par la méthode de LEIFSON (mordançage et coloration à la fuchine basique) (annexe II),

Coloration des inclusions de P β OHB par la méthode de BURDON modifiée par HAYWARD (28, 71) sur frottis provenant d'une culture de 48 h en milieu gélosé P β OHB (annexe II) et examen de la réfringence en contraste de phase (27).

222 - bactériologie

Chaque fois que possible a été observé l'aspect cultural des souches sur les différents milieux.

La production éventuelle de pigments bruns diffusibles est observée sur TYR (annexe II) et celle de pigments fluorescents sur KING B (annexe II).

223 - biochimie - physiologie

Pour les tests, en l'absence d'autres précisions, 3 gouttes (3/20ml) d'une suspension de 10^7 bact./ml (planche V) constituent l'inoculum.

Le métabolisme est étudié sur H.L. (annexe II),

l'existence d'une cytochrome oxydase est testée par le réactif de KOVACS Bio Mérieux imprégnant des disques,

d'une catalase par de l'eau oxygénée 20 vol. GIFFRER, d'une nitrate réductase et d'une production de gaz à partir de nitrites sur EPN à 1, 2, 4, 5 et 8 jours d'incubation (annexe II).

La tolérance à NaCl est testée par la croissance sur NaCl 0,5 ; NaCl 1 ; NaCl 2 (annexe II).

La capacité à utiliser une collection de sucres, d'alcools et d'acides organiques comme seule source de carbone et d'énergie est testée sur ARJ (annexe II). Le substrat carboné stérile est incorporé au milieu de base légèrement gélosé. La lecture est faite tous les 2 jours jusqu'au 21e. Deux témoins sont réalisés : ARJ pur et ARJ + substrat carboné.

L'utilisation de citrate de Na est testée par la méthode de SIMMONS (annexe II) (22) et se traduit par un virage au bleu du milieu en 2 à 5 jours.

L'utilisation des composés azotés est testée sous différentes formes :

L'activité décarboxylase est étudiée sur 2 substrats, LYS et ORN par la méthode de TAYLOR (annexe II) et se manifeste par un virage au bleu violet des milieux ODC et LDC en 48 h.

L'activité ARG DH est étudiée par la méthode THORNLEY (annexe III) et se manifeste par une coloration pourpre de la partie en anaérobiose du tube d'IVAN HALL contenant le milieu ARG DH en 3 à 7 jours.

Les activités ARG DH, LDC, ODC sont contrôlées par la méthode de MÖLLER en utilisant le milieu deshydraté de Bio Mérieux et en y incorporant 1 % de L-ARG, L-LYS, L-ORN. Le milieu de base est ensemencé afin de contrôler le comportement des souches en l'absence du substrat azoté (annexe III).

L'activité de la T.D.A. est étudiée sur le milieu uréase de FERGUSON : URE F (annexe III) et se traduit par une coloration brun rouge en 24 h en présence de chlorure ferrique.

L'UREASE est étudiée sur les milieux URE F, URE D et URE C (annexe III). L'activité se traduit sur URE F par l'apparition d'une teinte rouge violacée en 12 h ; sur URE D, orangée pourpre, en 2 à 4 jours (2 témoins : un sans urée inoculé, un avec urée non inoculé) ; sur URE C par le rosissement du milieu gagnant progressivement le culot à partir de la pente en 12 jours.

La formation d'INDOLE à partir du TRP est étudiée sur ALMT (annexe III) et révélée au bout de 48 h par le réactif de KOVACS (22) qui provoque en présence d'indole l'apparition d'un anneau rouge cerise à la partie supérieure du tube. Un contrôle est effectué sur URE F de la même façon.

L'HYDROLYSE de la GELATINE est étudiée sur le milieu GELATINE (annexe III) et révélée au bout de 8 jours par le réactif de FRAZIER (22) qui opacifie la gélatine : un halo clair autour du spot indique une hydrolyse.

L'utilisation de polysaccharides est testée sous différentes formes. L'activité HYDROLYSE de l'AMIDON est étudiée sur le milieu AMIDON et est révélée au bout de 8 j par de l'eau iodoiodurée (LUGOL) qui colore l'amidon en brun en laissant apparaître un halo clair autour de la colonie ayant hydrolysé l'amidon (annexe III).

L'activité HYDROLYSE de la CELLULOSE est étudiée sur le milieu CX d'OSHIRA (annexe III) en notant au bout de 8 jours d'incubation l'apparition d'une cuvette (diamètre en mm) autour de la culture ayant une activité cellulolytique.

L'activité PECTINOLYSE est étudiée sur le milieu PECTINE de PRUNIER (annexe III) pendant 24 jours. Un autre type de milieu, à polypectates, mis au point par HILDEBRAND (annexe III) (32, 33) est testé sous ses trois formes de pH : Hd A - pH acide, Hd B - pH neutre, Hd C - pH basique. On note l'apparition de cuvettes (diamètre en mm) autour des cultures ayant une activité pectinolytique en même temps que l'alcalinisation du milieu par le virage de l'indicateur coloré.

Parmi les tests divers, ont été effectués sur TWE (annexe IV) la recherche d'une tween estérase dont l'activité se traduit par le dépôt d'un précipité d'acides gras autour de la culture au bout de 8 jours d'incubation ;

d'une DNase sur le milieu déshydraté de Bio Mérieux, l'activité se traduit par une zone transparente autour de la culture dégradant l'ADN, zone révélée par l'HCl N opacifiant le milieu, au bout de 8 jours d'incubation ;

d'une production d'H₂S sur CYST (annexe IV), le gaz provoque la coloration noire d'une bandellette de papier filtre imprégnée de sous-acétate de plomb (formation de sulfure de plomb), examen fait tous les jours pendant 8 jours ;

d'une hydrolyse de la caséine sur LAIT (annexe IV) se manifestant par éclaircissement du milieu en 8 jours.

23 - Sérologie

Ne disposant pas d'antisérums, 7 souches ont été choisies :

Pd1, 1810 (pomme de terre)

TO₃, Au1a, Ge31 (tomate, aubergine, géranium)

Ba₁, Ba₉ (bananier) afin d'en obtenir selon le protocole explicité en annexe (annexe V).

Ces sérums de lapin antibactériens ont été comparés entre eux par rapport à 8 souches bactériennes : Pd1, 1810, TO₁, TO₃, Au1a, Ge31, Ba₁ selon la technique de l'immunofluorescence indirecte décrite en annexe (annexe VI).

24 - Antibiotiques

Nous avons tenté avec B₁₀, S₁₀, Va₃₀, OL₁₅, Te₃₀, K₃₀, C₃₀, L₂, A₃₀ et P₁₀, de retrouver les résultats d'HAYWARD ou de les préciser, en choisissant des charges d'antibiotiques différentes de celles employées par lui.

La principale difficulté réside dans le choix d'un milieu approprié à l'antibiogramme. Différents essais ont été effectués sur TTC +, Muller-Hinton (M.H.) de Bio Mérieux, KING B. Le choix s'est porté sur le milieu de KING B offrant après 48 h d'incubation les meilleurs résultats avec un inoculum bactérien de 10⁷ bact./ml semé en nappe, sur laquelle sont déposés les disques prêts à l'emploi de Bio Mérieux (5 par boîte de Petri).

Trois précautions sont prises : séchage à 27° C du milieu avant ensemencement et après, diffusion de l'antibiotique à température ambiante pendant 2 h, quatre répétitions minimum pour chaque antibiotique testé.

25 - Recherche de bactériophages

Ne disposant pas de bactériophages de *P. solanacearum*, nous avons tenté d'en isoler du sol selon le protocole décrit en annexe (annexe VII) (28, 63). Trois essais ont été effectués : sur un sol de jardin de Montpellier, un sol de champ de tomates infectées par *P. solanacearum* provenant de la Guadeloupe, un sol de champ d'aubergines de même origine.

26 - Tests Tabac - Cotonnier

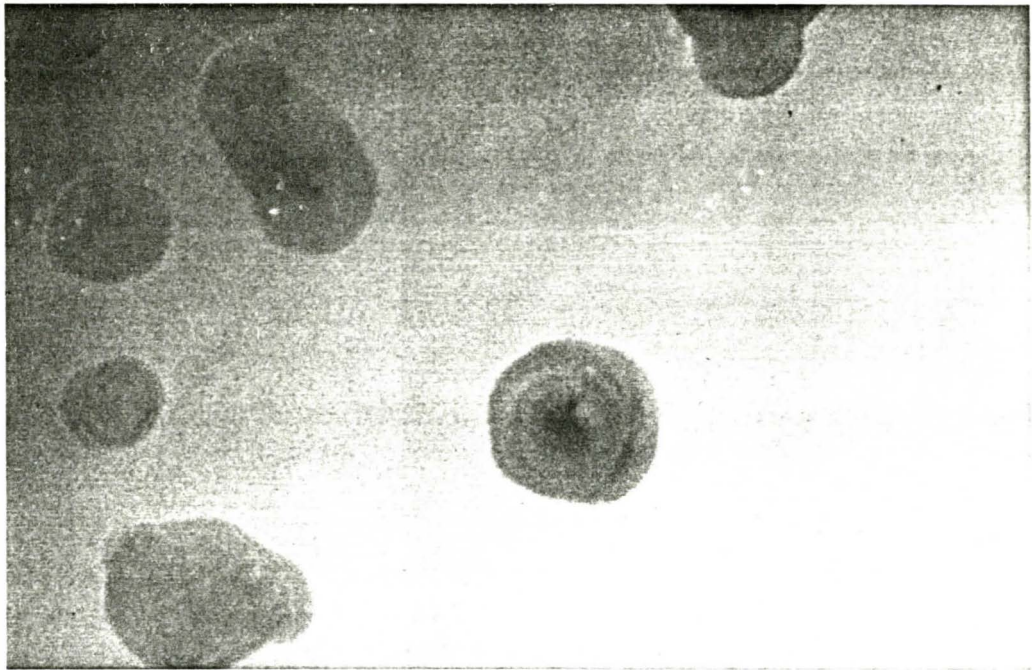
261 - test Tabac

Nous avons pratiqué l'infiltration de 4 à 5 espaces internervaires par feuille (2 adultes, 2 juvéniles) de *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN âgé de 3 mois à raison d'une souche bactérienne par pied. Les suspensions bactériennes, dont la concentration est donnée graphiquement connaissant l'absorbance, (planche V) (tableau X) sont réalisées à partir de colonies virulentes isolées sur TTC + incubé 48 h.

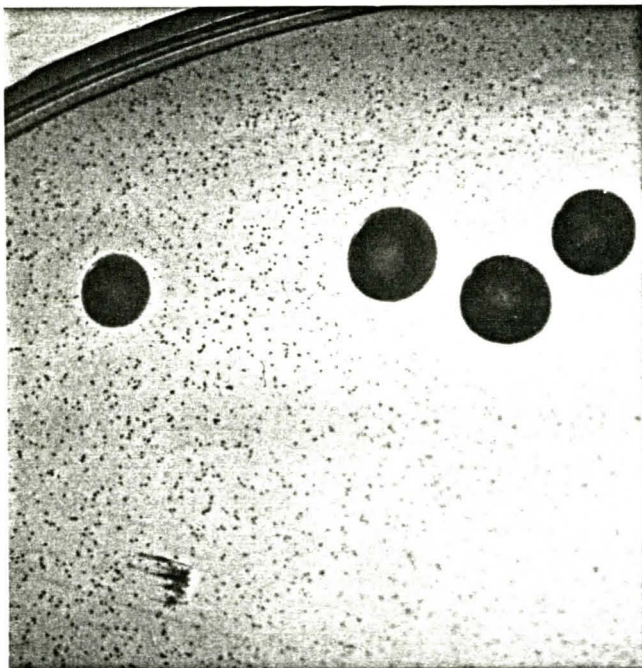
Les plantes sont maintenues à température ambiante en éclairage naturel. Les observations sont faites tous les jours pendant 5 jours.

262 - test Cotonnier

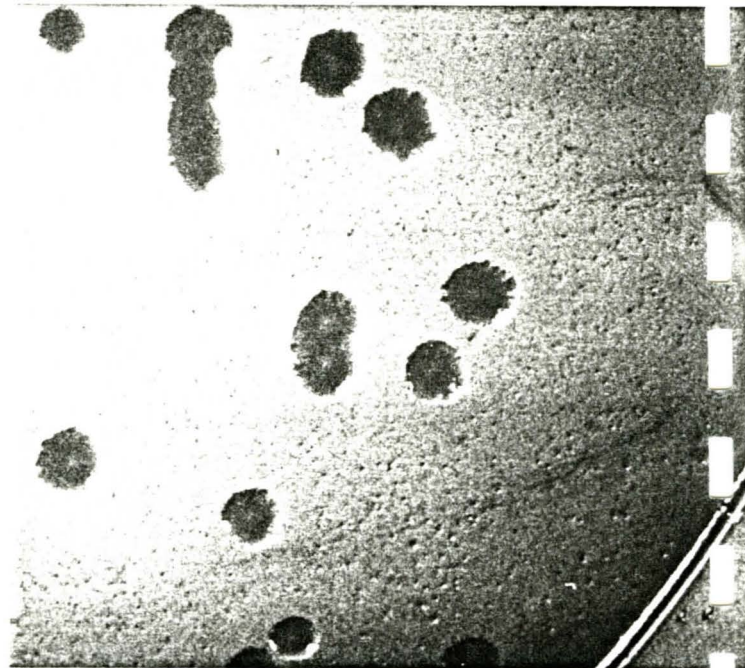
Il a paru intéressant d'infiltrer un des 2 cotylédons de jeunes plantules de 8 jours, 3 plantules par souche et par cultivar de *Gossypium* sp. : cv. sensible à la bactériose du cotonnier HAR L299-10, cv. résistant REBA B50. Les suspensions bactériennes utilisées sont les mêmes que pour le test Tabac (tableau X). Une échelle de 0 à 7 a été établie pour noter les manifestations apparues après l'infiltration de tout le limbe cotylédonnaire (tableau XI). Les observations sont faites pendant 12 jours, les plantules étant maintenues en chambre chaude à 30° C éclairée 12 h par jour.



Aspect d'une colonie virulente de la souche Pd1 sur TTC +
après 48 h d'incubation



Souche Pd1



Souche T0₂

Aspects de colonies sur KING B après 48 h d'incubation

27 - Tests d'inoculation artificielle

Nous avons utilisé 2 cultivars de *Lycopersicum esculentum* Mill. cv. merveille des marchés et hybride de 1^e génération java ; un de *Solanum melongena* L. cv. violette longue hâtive ; un de *Capsicum annuum* L. cv. carré doux extra hâtif ; un de *Solanum tuberosum* L. cv. Sterling.

Les plantes sont sensibles et en pleine croissance : pomme de terre de 50 cm de hauteur (72), les autres plantes ayant 2 mois (1 mois de semis en vermiculite, repiquage en terreau stérile pendant 1 mois). Leur croissance a lieu en serre (30° C - 25° C) ou en chambre chaude (30° C).

L'inoculum provient de cultures de 48 h sur TTC + et est de 10^7 bact./ml pour le test pomme de terre, 10^8 bact./ml pour le test tomate hybride de 1^e génération, 10^9 bact./ml pour les autres tests.

La technique d'inoculation retenue est celle de WINSTEAD-KELMAN (72) de la piqûre de la tige à travers une goutte d'inoculum déposée à l'aisselle de la 4^e feuille bien développée à partir de l'apex. La notation des symptômes selon l'échelle de WINSTEAD-KELMAN (72) de 0 à 5 est conduite sur 45 jours :

- 0 = pas de symptômes
- 1 = 1 feuille partiellement flétrie
- 2 = 2 feuilles flétries
- 3 = tout flétri sauf feuilles apex
- 4 = tout flétri
- 5 = mort.

Une étude cytologique a été effectuée sur tiges de tomates hybrides inoculées par 1810. Des isoléments de bactéries, à partir de plantes mortes, ont été réalisés sur TTC + additionné d'actidione à 1/‰ selon la technique suivante : macération pendant 6 h de fragments de tige ou de feuille en eau distillée stérile et étalement de 3 gouttes (3/20ml) de la suspension ainsi obtenue.

3 - RESULTATS

31 - Caractères culturaux

La taille des colonies varie de 1 à 2 mm de diamètre après 12 d'incubation et de 2 à 5 mm après 24 h sur TTC +. Leur aspect est représenté en annexe (planches I, II). La vitesse de croissance est homogène et identique sur TTC +, TTC -, LPGA ; légèrement ralentie sur KING B (planche III). Cette croissance est pratiquement nulle sur M.H., phénomène en relation avec la teneur en NaCl du milieu supérieure au seuil de tolérance de la bactérie (1 %). Les colonies des souches Ba₁ à Ba₉ sont de type SFR. Une seule souche (TO₄) a une fréquence d'apparition de mutants avirulents non négligeable.

1810 et Ba₁ sont mobiles à 100 %, Pd5 à 10 %, Ba₉ à 20 % et Ge1a à 30 % (tableau III). La coloration des flagelles a été un échec mais la perte ou l'absence de flagelles des isolats virulents en culture solide semble cependant confirmée. On note par ailleurs l'existence pour toutes les souches de chaînettes de corps bactériens plus ou moins longues dans l'examen à l'état frais.

La production de mélanine sur TYR (tableau III) est présente pour tous les isolats mais à différents degrés d'intensité. La diffusion de ces pigments est observée sur KING B et LAIT également. Les souches Ba₁ à Ba₉ possèdent une Tyrosinase. Il n'y a pas de pigments fluorescents sur KING B. Toutes les souches renferment des inclusions de P_gOHB dans leurs cellules.

32 - Caractères biochimiques et physiologiques - Biovars

Après vérification des caractères d'espèce (tableau III), nous avons regroupé les résultats d'utilisation des sources carbonées à la façon d'HAYWARD modifiée par HARRIS (tableaux II et I bis). Nous avons pu ainsi déterminer les biovars des différentes souches.

Les 5 souches de biovar I (Ba₁ à Ba₉) sont de sous-type E (TWE- , TYR +). Nous remarquons d'autre part que le biovar I correspondrait à la race 2 ; le II concerne une seule souche (1810) dont il faut confirmer par ailleurs l'appartenance à la race 3 ; les III et IV seraient représentés par des souches de race 1. La relation entre biovars et spécificité d'hôte semble bonne mais doit être étayée par les tests d'infiltration et d'inoculations artificielles.

Un certain nombre de différences dans les caractères peuvent être notées en comparant les tableaux II et II bis, dues à l'importante variabilité biochimique de *P. solanacearum*. Un nombre restreint de tests (6 souches carbonées) peut définir le biovar mais pour établir le caractère variant d'une souche intermédiaire, il faudrait tester une soixantaine de substrats dans plusieurs cycles d'observations étalés dans le temps.

La dénitrification est effective pour les biovars III - IV, inexistante pour le I (4 souches sur 5). La souche 1810 (II) ne devrait pas produire de gaz à partir des nitrites mais la réaction a lieu dès le 4^e jour (moyenne d'apparition). Il faudrait disposer d'autres isolats de type II pour contrôler la variabilité de ce caractère.

L'activité de l'ARG DH est vérifiée ainsi que celles de l'ODC et de la LDC, excepté pour 1810 (LDC et ODC-). Le test de TAYLOR est plus sensible que celui de MÖLLER : seule l'activité ARG/Mö est confirmée (tableau III). L'activité de la TDA paraît nulle (4 réactions douteuses sur 18) (tableau III).

La production d'indole est vérifiée pour les biovars I, III, IV mais pas pour le II. Les souches Ge1a, Ge31 (IV) s'apparentent à 1810 (II) pour ce caractère, sur ALMT, plus sensible que URE F (tableau III).

Toutes les souches possèdent une uréase sur URE C, D et F (tableau III). Les différences apparaissent sur URE F : Biovar I à activité moyenne ++ (4 sur 5), II à activité nulle, III à activité variable + à +++, IV à activité soit nulle soit forte. Ces réponses semi-quantitatives sont possibles par l'utilisation tout au long de ces tests d'un inoculum calibré. Elles sont assez bien recoupées par la vitesse de réaction sur URE C : biovars I et III 7 jours en moyenne, IV 10 jours, II 12 jours. L'uréase apparaît comme un caractère sélectif intéressant à exploiter pour séparer les souches en contrôlant rigoureusement les conditions d'expérimentation.

L'hydrolyse de la gélatine est effective comme celle de l'amidon contrairement à ce que l'on aurait pu prévoir. Mais dans les deux cas, l'exploitation du milieu est strictement circonscrite à l'emplacement de la colonie (croissance faible) et traduit une activité réduite des hydrolases (tableau III).

Toutes les souches sont Cx +. Le diamètre des cuvettes semble indiquer une activité plus importante du biovar I mais il faudrait maîtriser le calibrage de l'inoculum solide pour faire des comparaisons plus poussées.

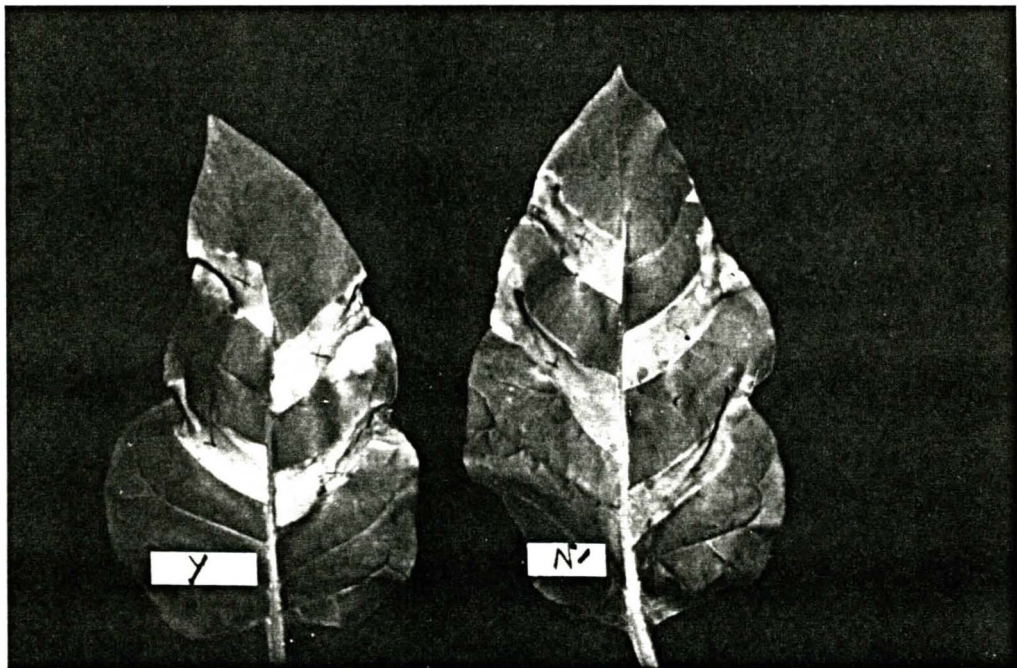
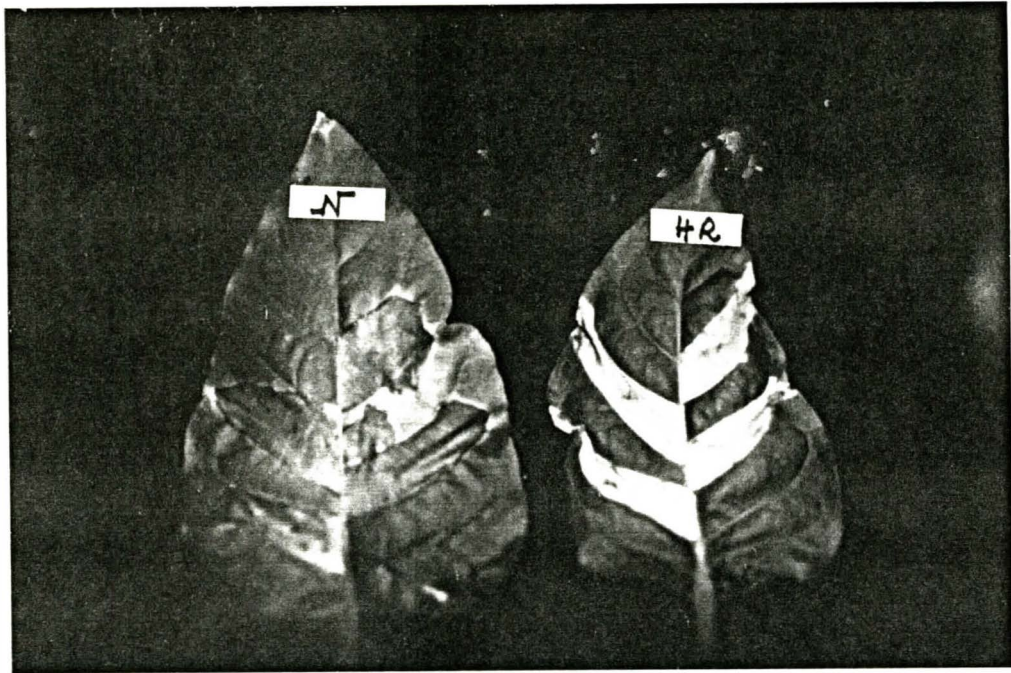
L'activité pectinolytique est vérifiée sur Hd A, B et C mais semble préférentielle sur Hd B : cuvettes plus grandes, alcalinisation plus poussée du milieu. Le biovar I paraît moins pectinolytique, aux variations du calibrage de l'inoculum près. Sur milieu de Prunier, les biovars I - IV sont pectine +, le II et III pectine -. Ceci pose le problème du choix du substrat, polymérisation et composition biochimique ; paramètre apparent de la séparation des souches (tableau III).

Les résultats des divers autres tests sont donnés en annexe (tableau III).

33 - Caractères sérologiques

De l'étude comparée par la technique de l'immunofluorescence indirecte, il résulte que les 8 souches réagissent au titre 1/10480 avec l'As Pd1 de titre 1/10480. Les autres réactions sont représentées graphiquement en annexe (planche VI).

On note que les souches réagissent toutes avec les différents As ce qui indique qu'elles ont au moins un Ag commun. Les relations vis-à-vis de l'As 1810 (biovar II, race 3) de titre 1/2560 semblent indiquer un comportement sérologique différent pour Ba₁, Ba₉ (1/160) ; TO₁, TO₃, Au1a (1/640) et Ge31 (1/1280). Ceci semble encourageant pour la mise au point d'un As-race 3. Les relations avec les autres sérums sont homogènes aux variabilités de la technique près, peut-être à un degré moindre avec l'As-Ba₁.



Test Tabac (*Nicotiana tabacum* c v. Samsun NN)

N	nécrose à halo chlorotique	race 1
N'	nécrose sans halo chlorotique	race 1
HR	hypersensibilité	race 3
Y	jaunissement	race 2

Il est intéressant de noter que l'As-Pd1 préparé avec des bactéries entières vivantes donne la relation la plus homogène et la plus élevée en titre. Ceci pose le problème de la préparation de l'Ag. Il faudrait extraire les Ag polysaccharidiques ; sensibiliser au moins trois lapins par souche afin de diminuer la variabilité due aux qualités sérologiques plus ou moins grandes des animaux ; prolonger les manipulations jusqu'à l'obtention d'une immunité stable en titre. Sur ce dernier point, il est probable que l'immunité que nous avons obtenue est susceptible d'évoluer avec de prochains rappels ce qui pourrait accentuer les différences des propriétés sérologiques des souches ou au contraire les supprimer.

34 - Relations vis-à-vis des antibiotiques

Elles sont données sous forme de tableau en annexe (tableau IV). On constate que les souches sont uniformément sensibles à S_{10} , C_{30} , K_{30} ; sensibles à Te_{30} A_{30} sauf TO_2 résistante ; uniformément résistantes à L_2 : résultats obtenus par ailleurs par différents auteurs.

Nous avons regroupé dans le tableau IV bis les relations des souches vis-à-vis de B_{10} , CL_{15} , Va_{30} , P_{10} , plus différentielles ; sur la base de leur appartenance aux 4 biovars, en portant le nombre de souches sensibles (S), Intermédiaires (I) et Résistantes (R).

Il semble, bien que la charge de l'antibiotique soit 3 fois plus élevée, que la relation déterminée par HAYWARD, en 1976 sur des souches australiennes vis-à-vis de l'oléandomycine (30) soit confirmée en 1983 sur notre collection : biovar II = R III = R ou S, IV = S. Les relations vis-à-vis de Va_{30} et P_{10} sont inexploitable car les souches I sont proches des R (limite supérieure de d). La relation vis-à-vis de B_{10} donne : biovar I = I, II = S et IV = R, le III étant hétérogène. Ceci semble correspondre à une spécificité d'hôte plus ou moins restreinte. Ce résultat, s'il est confirmé avec de nouvelles souches, permet de recouper la séparation en biovars au même titre que pour OL 15 ou OL 5.

35 - Bactériophages

Nos tentatives d'isoler des bactériophages à partir du sol se sont soldées par des échecs. L'étude lysotypique n'a pu être menée plus avant.

36 - Caractères en relation avec les tests Tabac - Cotonnier

361 test Tabac

Bien qu'effectué sur *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN, le test permet de déterminer, comme celui de LOZANO-SEQUEIRA (51), les différents pathovars (tableau X). Cependant, nous n'avons pas observé de flétrissement généralisé des plantes avec la race 1. L'apparition de la nécrose N est rapide (24 h au lieu de 36) alors que le développement du halo chlorotique s'étend sur 5 jours. L'hypersensibilité HR est moins rapide (24 h au lieu de 12) mais nous ne disposons que d'une seule souche présumée de race 3. Le jaunissement Y dû à la race 3 est lui plus rapide (24 h au lieu de 48), on relève une seule réaction douteuse (Ba_3).

Nous n'avons pas noté de différences notables de réponses entre les feuilles âgées et juvéniles. Les variations de développement du halo chlorotique semblent liées à des concentrations différentes d'inoculum.

362 - test Cotonnier

Les résultats donnés en annexe (tableau XI) permettent un certain nombre de conclusions.

Il n'y a pas de différences importantes entre les réponses du cultivar sensible et celles du résistant.

Nous constatons qu'il n'y a jamais flétrissement généralisé des plantules infiltrées avec les souches Ba_1 à Ba_9 alors qu'il se produit souvent, entraînant la mort, quelquefois, avec les autres souches. L'aspect des feuilles développées par les plantules après la chute du cotylédon infiltré est comparable à celui des feuilles témoins dans le premier cas alors qu'elles sont plus petites, mal formées et présentent des nécroses marginales dans le deuxième. Il semble donc que la bactérie se soit multipliée dans les plantules, à partir de l'infiltration d'un cotylédon par les souches de race 2.

S'il est confirmé, ce résultat permettrait de distinguer aisément les souches de race 2 des souches de race 1 ou 3.

37 - Caractères en relation avec la "gamme" d'hôtes

371 test d'inoculation de *Solanum tuberosum* L. cv. Sterling

Les résultats sont donnés en annexe (tableau IV) : nous avons relevé, en fonction de la souche inoculée et du temps (t) écoulé depuis le jour de l'inoculation (t_0), les symptômes de flétrissement (présentés par 3 plants) notés de 0 à 5 selon l'échelle de WINSTEAD-KELMAN (72). Par exemple, à $t_0 + 3$, le 1er plant inoculé par Pd1 ne présente pas de symptôme (0), le 2e a une feuille partiellement flétrie (1), le 3e deux (2), ce qui donne dans le tableau la notation suivante :

souche inoculée	Pd1
t(jours)	
$t_0 + 3$	0 1 2

Nous constatons que seules les souches isolées de pomme de terre (Pd1, Pd41, 1810) ont entraîné la mort par flétrissement. La souche isolée de géranium rosat Ge1a a un comportement semblable (biovar IV comme Pd41 ?).

Le temps de latence est élevé et peut-être relié à la densité faible de l'inoculum (10^7 bact./ml).

Le brunissement des vaisseaux est visible tout le long de la tige pour les plants infectés par Pd1, 1810, Pd41, Ge1a ; limité à 2 cm environ au-dessous du point d'inoculation pour les autres : faible croissance bactérienne dans ce cas, ce que confirment les tentatives de réisolement de la bactérie. Les symptômes relevés en fin de test pour ces plants semblent dus aux fortes variations de température subies, les plants témoins présentant eux aussi des signes de chlorose et de flétrissement.

372 - test d'inoculation de *Lycopersicum esculentum* Mill. cv. F1 java

Les résultats sont donnés en annexe (tableau VI).

Le temps de latence diminue ici avec l'augmentation de la densité de l'inoculum (10^8 bact./ml). Dès $t_0 + 3$, on note la formation d'exsudat bactérien au point d'inoculation et le brunissement de la tige, déjà visible pour tous les plants quelque soit la gravité des symptômes de flétrissement.

A $t_0 + 24$, une rhizogénèse plus ou moins accentuée se déclare sur plants inoculés par 1810, Pd41, T_{01} , Au1a et Ge31. Le brunissement des vaisseaux s'accroît et se généralise pour les plants infectés par Ge1a et Ba₁ ; reste localisé pour ceux infectés par 1810, Pd41, Ba₃, Ba₅, Ba₇ ; ne paraît pas pour les autres se développer davantage.

L'infection, sur les plants inoculés par 1810, développe un épaississement lignifié de la tige, qui double de diamètre. Des coupes anatomiques colorées au bleu de toluidine font apparaître par rapport à une tige saine des dépôts vasculaires noirs ; des collapsus vasculaires et parenchymateux orientés (du côté de l'inoculation) ; des figures de thyllose ; un épaississement de l'assise libéro-ligneuse orientée, avec formation de racines ; la dégradation du parenchyme médullaire et la lignification du cortical. Toutes les cellules vasculaires ou parenchymateuses sont remplies de bactéries, ce qu'ont confirmé les réisolements.

La vitesse du développement de l'infection due aux souches de races 2 et 3 est moindre que celle due aux souches de race 1, excepté pour le biovar IV.

373 - test d'inoculation de *Lycopersicum esculentum* Mill. cv. merveille des marchés

Les résultats sont donnés en annexe (tableau VII).

Le temps de latence est très faible (inoculum de 10^9 bact./ml).

Nous observons une rhizogénèse sur les plants infectés par T_{01} , T_{02} , Ba₅, Ba₇, Ba₉ beaucoup moins développée que précédemment. La souche 1810 provoque les mêmes symptômes internes, mais de façon atténuée, par rapport au test précédent.

Le brunissement des vaisseaux est étendu à toute la tige quelque soit le plant. Il semble que le cultivar merveille des marchés soit cependant moins sensible que le F1 java.

Nous remarquons que la vitesse du développement de l'infection par les souches de race 2 (Ba₁ à Ba₉) est ici aussi moins grande que celle due aux souches de race 1 et 3 : Ba₇ ne réussissant même pas à se multiplier, ce qu'ont confirmé les réisolements.

374 test d'inoculation de *Solanum melongena* L. cv. violette longue hâtive
Les résultats sont donnés en annexe (tableau VIII).

Le flétrissement s'accompagne ici d'une chlorose, généralisée pour les plants infectés par Pd₄₁, T₀₁, T₀₂, Ba₇, Ba₉, significative par rapport aux témoins.

Il ne semble pas y avoir des différences de pouvoir pathogène entre les souches sinon au niveau de la vitesse du développement de l'infection cependant ceci ne peut être relié ni au biovar ni à la race des isolats.

375 - test d'inoculation de *Capsicum annuum* L. cv. carré doux extra hâtif
Les résultats sont donnés en annexe (tableau IX).

Le flétrissement s'accompagne ici d'une légère chlorose par rapport aux témoins pour les plants infectés par Pd₁, T₀₁, T₀₃.

Le pouvoir pathogène des souches de race 2 semble nul sur ce cultivar contrairement à celui des souches de race 1 (biovar IV intermédiaire ?) et 3. Les infections sont en général longues à se déclarer, malgré une densité d'inoculum forte ; et à se développer jusqu'aux stades 3 - 4 ; ensuite l'effet est foudroyant. Un inoculum plus élevé (10¹⁰ bact./ml) devrait permettre l'amélioration de la qualité discriminative du test.

Notons enfin que la technique d'inoculation n'a eu aucune incidence sur l'apparition des symptômes (témoins piqués et piqués avec eau distillée stérile identiques aux témoins intacts).

4 - CONCLUSIONS

La séparation des 18 isolats en types biochimiques s'avère facile et assez rapide à mettre en oeuvre selon la méthode d'HAYWARD (30). Nous remarquons que sur les 12 souches provenant de La Réunion, 9 appartiennent au biovar III, 3 au IV. Nous pouvons considérer qu'un seul type biochimique est abrité sur cette île puisque différents auteurs (69) s'accordent à regrouper les biovars III et IV. A Grenade, seul le biovar I est répandu alors qu'en Haïti coexistent le I et le II.

La détermination du biovar peut donc être un outil de choix dans l'étude de la répartition géographique des nombreuses populations de *P. solanacearum* au plan taxonomique (18, 62). Indispensable au bactériologiste (4), elle permet au phytopathologiste de contrôler l'introduction de nouveaux types dans les isolats géographiques. Par exemple, pour la souche nouvellement isolée Pd₅, il était important de déterminer son appartenance soit aux biovars I, III ou IV, soit au II, généralement relié à la race 3 spécifique de la pomme de terre, afin de mener une lutte sanitaire appropriée.

En ce qui concerne l'étude biochimique, l'utilisation de l'URE C et des Hd A, B, C est de type à apporter de nouveaux éléments à la connaissance des biovars.

Si la séparation des souches par les sérotypes n'a pas été possible, les As préparés pourraient servir au diagnostic au champ de *P. solanacearum*. N'étant pas spécifiques, leur utilisation ne peut être que de caractère négatif : éliminer la possibilité d'une infection par *P. solanacearum*. La détermination du support du pouvoir pathogène et son emploi comme Ag peut seule permettre la relation sérologie-pathogénie et apporter des éléments précieux au diagnostic, à la détection de la maladie, à l'épidémiologie, à l'étude de la résistance de la maladie et à celle du couple hôte-parasite (9, 10, 11).

La lysotypie pourrait être avantageusement remplacée par la recherche de bactériocines dont la production différentielle a pu être reliée aux biovars (12, 13).

L'utilisation des antibiotiques, malgré de multiples difficultés (répétabilité douteuse due au type de milieu utilisé, standardisation de la suspension bactérienne indispensable, maîtrise de la diffusion de l'antibiotique, contrôle de la qualité de la croissance bactérienne), est prometteuse pour la caractérisation des biovars. Il conviendrait de contrôler les relations envers OL 15 et B 10 de façon statistique d'une part et d'autre part de tester des gammes croissantes de charges pour les antibiotiques ayant donné une réponse uniforme.

L'utilisation du cultivar Samsun NN de *Nicotiana tabacum* L. pour le test Tabac s'est révélée satisfaisante. Ce test reste indispensable pour la distinction des souches selon les pathovars, en particulier pour les souches isolées de pomme de terre qui peuvent être de race 1 ou 3. Pour être tout à fait exploitable, ce test devrait donner lieu à des répétitions nombreuses, avec un inoculum standardisé, en contrôlant les périodes d'exposition à la lumière, le degré hygrométrique et la température de la salle d'expérimentation.

En ce qui concerne le test Cotonnier, les résultats intéressants obtenus : distinction entre race 2 et races 1, 3 ont incité l'I.R.C.T. à démarrer une étude statistique du phénomène dont les premiers résultats semblent confirmer les nôtres.

Les tests d'inoculations artificielles sont de qualité variable selon les cultivars mais globalement nous avons pu reproduire tous les symptômes externes et internes (1810/TOF₁) du flétrissement bactérien, avec toutes les souches dont nous disposons. L'isolement, à partir de feuilles de plantes malades ou de tiges de plantes mortes, sur TTC+, confirme l'existence d'une grande quantité de *P. solanacearum* vivant virulent.

La séparation des souches selon leur pouvoir pathogène vis-à-vis de l'ensemble des cultivars pourrait s'opérer en fonction de la vitesse de développement des symptômes, la densité de l'inoculum paraissant n'influer que sur le temps de latence d'infection. Sous cet angle, nous remarquons le faible pouvoir pathogène des souches de race 2 vis-à-vis des hôtes utilisés (à l'exception de l'aubergine). Parmi les souches de race 1, il semble que les réponses dépendent de l'hôte d'origine d'une part et que l'on puisse même distinguer le biovar IV (Pd41, Ge1a, Ge31) du III au sein de ce pathovar d'autre part. Il faudrait, pour préciser ces résultats, étendre le nombre d'expérimentations tant sur le plan du nombre de plantes inoculées par souche que sur celui du nombre de souches comparées ; tout en contrôlant rigoureusement les conditions du test (inoculum, température, état physiologique des plantes, nutrition, etc.). La miniaturisation *in vitro* des tests d'inoculations artificielles devrait pouvoir offrir ces garanties et permettre une investigation plus poussée.

De façon plus générale, il nous apparaît à présent indispensable de comparer cette petite collection d'isolats de *P. solanacearum* à des souches de biovars et pathovars - références afin d'élargir l'étude de la variabilité des populations au sein de l'espèce.

ANNEXE I

LISTE DES PAYS HEBERGEANT *P. solanacearum*

Map No. 138 Edition 5

Host key: A = potato B = tobacco C = Solanaceae other than 2 before D = Musaceae E = Other hosts

AFRICA

- Algeria [C, 11:808; Kelman, 32:671]
 Angola [A, 39:555; C, E, 47, 3400]
 Canary Isl. [A, EPPO Conf. 1960, 41:57: considered free from pathogen. G.M. Suarez in litt. Apr. 1975]
 Egypt [A, 45, 1490]
 Ethiopia [A, Rep. Inst. Agric. Res., Addis Ababa, 1973-74: C, *Solanum melongena*. R.B. Stewart in litt.: E, 13:565; D, 52, 3504]
 Gabon [C, 46, 1941]
 Kenya [A, 38:449; C, 31:136; 42:297; E, 53, 96]
 Libya [D, 43, 967; E, 10:775]
 Malagasy Republic [A, B, C, E, Dadant et al., 40:405; E, 35:719]
 Malawi [A, 38, 655; B, C, E, Wiehe, 34:548; D, 55, 3400]
 Mauritius [A, 34, 773; B, 38:373; C, 38:657; E, 29:351; 32:614; 33:659; 38:657]
 Morocco [C, 13:63; E, Rieuf, 40:88]
 Mozambique [A, C, de Carvalho, 38:397]
 Nigeria [A, C.P. News 1965 (3):4; B, Ibid 10(2): 32, 1964, C, 49, 1570; D, E, 46, 1943]
 Reunion [A, Roger, 40:272; C, 46, 1179; E, *Pelargonium capitatum* in litt.]
 Rhodesia [A, 31:475; B, 35:508; C, 27:117; E, 27:117; 29:143. See also 30:79 for all hosts]
 Rodriguez Is. [A, C, Wiehe, 28:472]
 Ruanda & Burundi [A, B, C, 39:494]
 Senegal [D, 46, 576; E, Jaubert, 34:345]
 Seychelles [B, 51, 31010; C in litt. to J.F. Bradbury, Feb. 1969]
 Sierra Leone [A, B, C, ?D, E, Deighton, 35:7]
 Somalia [E, 13:565]
 South Africa [A, 24:49; 34:52; B, 6:143; C, 24:49; 26:331; 35:402; E, 27:172; Doidge et al., 34:385; 42:729]
 Tanzania [A, 27:353; C, 24:422; E, Kelman, 32:671; 28:246]

- Uganda [A, in litt.; B, C, E, 56, 116]
 Upper Volta [48, 1469]
 Zaire [A, 37, 447; B, 36, 309; C, 39, 494]
 Zambia [A, C, E, Riley, 36:3; 39:759; B, 44, 85]
- ### ASIA
- Bangladesh [C, 22:228]
 Brunei [C, 42:656]
 Burma [A, 6:398; B, 45, 2781]
 Cambodia [C, Litzenger et al., 41:641]
 China [A, 45, 2441; B, 40:764; C, Kelman, 32:671; Wang, 25:525; E, 45, 2441]
 Hong Kong [C, E, 48, 2857]
 India [A, general with crop, Mundkur, 28:632; 8:261; 24:430; 26:440; 31:574; 34:517; 38:274; B, (Mysore) 34:517; (Punjab) 16:656; C, (Bengal) 26:230; D, (W. Bengal) 48, 230; E, (W. Bengal) 49, 2495]
 Indonesia [(Celebes) A, 17:162; E, 1:327; (Java) A, 30:188; B, 29:125; C, 6:390; E, 14:153; 17:162; 34:340, 672; (Sumatra) A, 8:226; B, 17:632; C, 5:653; E, 4:318; 8:74; 14:153; 17:301; 26:418; 28:163; (W. Irian) C, E, 32:546]
 Iran [E, 52, 2544]
 Israel [A, C, 40:14; A, 28:79]
 Japan [A, B, C, Kelman, 32:671; C, 33:576; E, 20:9 and many records by Fujioka, 32:728]
 Korea [B, E, 7:121; Kelman, 32:671; C, 52, 1801]
 Lebanon [B, 49, 2395]
 Malaysia [(W) A, C, 39:537; B, 15:78; C, 29:12; ?D, 33:524; E, 32:367; ginger in litt. and many records by Thompson & Johnston, 34:548; (Sabah) B, C, E, Johnston, 40:151; D, Williams & Liu, *Phytopath. Pap.* 19, 1976]
 Philippines [A, Kelman, 32:671; B, 15:80; C, 2:261; 18:370; D, 49, 3579; E, 2:261; 5:671]
 Sri Lanka [A, B, 15:180; B, 13:78; C, 14:146; 19:384; 21:66; E, Anon., 15:632]

Map No. 138 Edition 5 (contd.)

- Taiwan [B, 26:422; C, 17:303; D, 45, 1328; E, 27:450]
 Thailand [B, C, 43, 965; D, 45, 3508]
 Turkey [B, 38:396, around Maras only]
 USSR (Siberia) [E, 45, 3320]
 Vietnam [A, 42:296; B, 14:126; D, Q. Newsl. Pl. Prot. Comm. S.E. Asia & Pac. 15:6. 1972; E, 46, 3031]

AUSTRALASIA & OCEANIA

- Australia [(NSW) A, 26:123; B, 32:175; 37:133; C, 19:69; 34:285; D delete record, Walker in litt., 1971; (Qd) A, 33:209; C, 29:62; E, 39:372; 47, 280; (NT) C, 47, 2844; E, 50, 1142; (Vict.) A, 28:538; 33:507; C, 54, 5349; (S. Aust.) A, B, C, 52, 1839; (W. Aust.) A, Kelman, 32:671; B, 42:746; C, 22:503]
 Fiji [A, C, 37:205; B, 16:196; E, 45, 946]
 Guam [C, 54, 392]
 Hawaii [A, B, E, Parris, 19:432; Kelman, 32:671; C, 22:343; E, 43, 181]
 New Zealand [A, 16:631]
 Papua New Guinea [B, C, 43, 968]
 Samoa (W) [C, 45, 946; 54, 4406]
 Tahiti [48, 1469]

EUROPE

- (for many doubtful records see Kelman, 32:671 and later EPPO reports)
 Bulgaria [B, C, E, 47, 2594]
 Cyprus [A, Georgiou & Papadopoulos, 37:7]
 Greece [A, 37:676]
 Italy [A, E, Kelman, 32:671; B, 37:421; C, 19:582]
 Poland [A, 41:57; B, 41, 698; C, 41:568]
 Portugal [A, 29:581; C, Kelman, 32:671; (Madeira) A, 45, 1490]
 Rumania [A, 41:57; B, 46, 1409]
 USSR [(Astrakhan) C, 10:493; (Krasnodar, Ukraine) E, 16:750; 43, 625]

NORTH AMERICA

- Canada [(Ont.) C, 46, 3383]
 Mexico [A, C, 55, 5647; E, 49, 3740]
 USA [(S., E. & Central States) A, B, C, E, Agric. Handb. USDA 165, 1960 (40:511); Kelman 32:671; (Fla.) D, 40:511]

CENTRAL AMERICA & WEST INDIES

- Costa Rica [A, 30:217; D, 37:493; C, D, E, Buddenhagen, 40:235; D, 40:551]
 Cuba [A, 51, 4761; B, C, Kelman, 32:671; D, 52, 3993]
 Dominica [A, 51, 3250; C, 34:84]
 Dominican Republic [A, 49, 2396; B, Kelman, 32:671; C, 51, 4761; ?D, 19:158]
 French Antilles [A, B, C, E, 34:518]
 Guadeloupe [A, C, 48, 1470; D, Kelman, 32:671]
 Guatemala [A, C, D, 49, 3185; E, 49, 3740]
 Haiti [D, Kelman, 32, 671; 53, 2317]
 Honduras [C, 49, 3740; D, 40:551]
 Jamaica [C, D, C.E. Henry in litt.]
 Martinique [A, C, 48, 1470]
 Nicaragua [C, D, 49, 3740]
 Panama [A, C, 49, 3740; B, 38:162; D, 40:551]
 Puerto Rico [A, 11:29; B, C, Kelman, 32:671]
 Salvador [A, C, Kelman, 32:671; D, 49, 3740]
 St. Lucia [A, 49, 2396; C, 51, 4761]
 St. Vincent [C, Kelman, 32:671]
 Trinidad [A, 49, 2396; C, 29:64; D, 40:551]

SOUTH AMERICA

- Brazil [A, 34:243, 314; B, C, E, Robbs, 35:752; C, 26:335; 40:75; D, Rev. Soc. Brasil. Fitopat. 5:191, 1972]
 Colombia [A, 29:528; B, C, D, E, 46, 3029; D, 45, 1445]
 French Guiana [C, 46, 2314]

ANNEXE I bis

Map No. 138 Edition 5 (contd.)

Guyana [A, E, 45, 2442; C, 35:750; D, 40, 551]
Peru [A, 50, 2109; B, 2719; D, 47, 1933]
Surinam [C, 35:727; Del Prado et al., 36:726; D, Surinam Agric. 24:85, 1976]
Venezuela [A, C, Standen, 32:38; D, 40:551]

NOTE: See CMI Descript. 15. Also: Kelman, 32:671; EPPO Conf. Rep., Bacterial Dis. of Potatoes, Paris, May, 1961; Buddenhagen (40:551) for bacterial wilt of banana and other Musaceae (French Guiana, 26:457; Ecuador, 37:362; Sierra Leone, 15:778; Malaysia, 33:524); for strains in S. & Central America, 49, 2735; for territories previously known as French West Africa, B, D, E, Mallemaire, 36:382.
Granada (D) 60/406

Numbers in square brackets e.g. [54, 1234] refer to
abstracts in the Review of Plant Pathology

ANNEXE II

MILIEUX DE CULTURE REACTIFS

TTC + (40)

peptone	10 g
hydrolysate de caséine	1 g
glucose	5 g
agar	18 g
eau distillée	1000 cc
tétrachlorure de tétrazolium 1 ml d'une solution stérile à 1 % pour 200 ml de milieu de base. Couler en boîtes de Petri.	

TTC - idem que TTC +, sans tétrachlorure de tétrazolium.

LPGA (47)

extrait de levure	5 g	
bactopeptone	5 g	
glucose	10 g	Couler en boîtes de Petri.
agar	15 g	
eau distillée	1000 cc	
pH 7,2		

KING B (22)

protéose peptone n° 3 DIFCO	20 g	
glycérol	10 g	
K_2HPO_4 anhydre	1,5 g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g	Couler en boîtes de Petri.
agar	16 g	
eau distillée	1000 cc	
pH 7,2		

E.P.N. (22)

bactopeptone	10 g	réactif a :	réactif b :
KNO ₃	1 g	acide sulfénilique 8 g	αnaphtylamine 6 g
eau distillée	1000 cc	acide acétique 1000 cc	acide acétique 1000 cc
Répartir en tubes (5 ml).			

P β OH B (27)

saccharose	20 g	- soudan noir B :
peptone	5 g	soudan noir B 0,3 g
K ₂ H PO ₄	0,5 g	éthanol à 70 % 100 cc
Mg SO ₄	0,25g	- safranine aqueuse à 0,5 %
agar	20 g	
eau distillée	1000 cc	
pH 7,2 à 7,4		
Couler en boîtes de Petri.		
Ensemencer en nappe.		

. Coloration des flagelles par la méthode de LEIFSON

Réf. bibliographique :

PIECHAUD in Traité de Biologie Appliquée tome II
 Les Diagnostics microbiologiques
 Librairie MALOINE S.A. Paris 1963.

. TYR (31)

saccharose	5 g	
hydrolysate de caséine dévitaminé	10 g	
K ₂ H PO ₄	0,5 g	
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,25g	Couler en tubes inclinés.
L-TYR	1 g	
agar	15 g	
eau distillée	1000 cc	
pH 7,2 à 7,4		

. H.L. (47)

peptone bactériologique oxoid	1 g	
N H ₄ H ₂ PO ₄	1 g	
K Cl	0,2 g	
Mg SO ₄ 7 H ₂ O	0,2 g	
Bleu de Bromothymol (BBT)	0,03 g	(virage du jaune au bleu pH 6,0 à 7,6)
glucose	10 g	
eau distillée	1000 cc	
Répartir en tubes d'Ivan Hall (12 ml).		

. NaCl (28)

milieu de base

peptone 5 g

extrait de levure 3 g

glucose 5 g

eau distillée 1000 cc

Répartir en tubes (5 ml)

NaCl 0,5 :

+ 5 g NaCl

(0,5 %)

NaCl 1 :

+ 10 g NaCl

(1 %)

NaCl 2 :

+ 20 g NaCl

(2 %)

ANNEXE III

MILIEUX DE CULTURE UTILISATION DES SUBSTRATS CARBONES

ARJ Milieu d'AYERS modifié HAYWARD (30,31)

peptone	1 g
$\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{O}_4$	1 g
KCl	0,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
BBT 1,6 %	1 ml
agar	1,5 g
eau distillée	1000 cc
pH	7,0

Les solutions de composés carbonés sont dissous à part dans de l'eau distillée et sont soit filtrées, soit autoclavées (59,61) 20 mn à 110°.

d (+) Cellobiose	solution à 10 %	filtrée
Dulcitol	" 2 %	autoclavée
Esculine	" 0,16 %	filtrée
d (-) Fructose	" 10 %	filtrée
d (+) Galactose	" 10 %	autoclavée
d (+) Glucose	" 10 %	autoclavée
Glycérol bidistillé	" 10 %	autoclavée
Hippurate de Na	" 10 %	filtrée
méso Inositol	" 10 %	autoclavée
Inuline	" 10 %	filtrée
Lactate de Na	" 10 %	filtrée
Lactose Monohydrate	" 10 %	autoclavée
di Na DL Malate	" 10 %	filtrée
Malonate de Na	" 10 %	filtrée
Maltose	" 10 %	filtrée
d (-) Mannitol	" 10 %	autoclavé dans ARJ
d (+) Saccharose	" 10 %	filtrée
Salicine	" 8 %	filtrée
d Sorbitol	" 10 %	autoclavée
d (+) Tréhalose	" 10 %	filtrée

Répartir 10 cc pour 90 cc d'ARJ. Couler en tubes (5 ml).

GELATINE (20)

hydrolysate de caséine dévitaminé	10 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
saccharose	10 g
Gélatine	30 g
Gélose	16 g
eau distillée	1000 cc

pH 7 - 7,2.

Couler en boîtes de Petri.

Ensemencer en spots.

C.S. (20)

Citrate de Na	5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$NH_4H_2PO_4$	1 g
K_2HPO_4	1 g
NaCl	5 g
BBT	0,08g
agar	10 g
eau distillée	1000 cc

Couler en tubes inclinés.

pH 7,2

ODC ou LDC (22)

L-LYS ou L-ORN	5 g
extrait de levure	3 g
glucose	1 g
pourpre de bromocrésol (1,6 % en éthanol)	1 ml (virage du jaune au pourpre pH 5,2 à 6,8)
eau distillée	1000 cc

pH 6,2 à 6,4

Répartir en tubes (12 ml).

ARG DH (22)

ARG mono HCl	10 g
Bactopeptone	1 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	0,3 g
Rouge de phénol	0,01g (virage du jaune au rouge pH 6,4 à 8,2)
eau distillée	1000 cc
Répartir en tubes d'YVAN HALL (12 ml).	

URE F (22)

L-TRP	3	g
K_2HPO_4	1	g
KH_2PO_4	1	g
NaCl	5	g
Urée	20	g
alcool à 90°	10	ml
Rouge de phénol 1 %	2,5	ml
eau distillée	1000	cc
Stérilisation par filtration.		
Répartir en tubes à hémolyse (0,5 ml)		

URE D (20)

$NH_4H_2PO_4$	0,5	g
K_2HPO_4	0,5	g
NaCl	0,2	g
extrait de levure	1	g
Rouge de crésol	0,016g	(virage du jaune au pourpre pH 1,8 à 7,0)
eau distillée	1000	cc
Ajouter une solution d'urée à 2 % filtrée.		
Répartir en tubes (5 ml).		

URE C (20)

peptone	1	g
glucose	1	g
NaCl	5	g
KH_2PO_4	2	g
urée	20	g
Rouge de phénol	0,012g	
eau distillée	1000	cc
Stérilisation par filtration.		
Ajouter 900 cc d'une eau gélosée stérile à 15 g/l.		
Couler en tubes inclinés.		

A.L.M.T. (20)

A (ARJ) :

$\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$	100 mg
K Cl	20 mg
$\text{Mg SO}_4 7\text{H}_2\text{O}$	20 mg
BBT à 0,2 %	2 mg
eau distillée	50 mg
pH 6,8	

Mélanger.

Répartir en tubes (5ml).

L.M.T.

Lactose	500 mg
Malonate de Na	300 mg
L-TRP	100 mg
BBT à 0,2 %	2 ml
eau distillée	50 ml
pH 6,8	

L- ζ ALA (20)

$\text{K}_2\text{H PO}_4$	1 g
NaCl	5 g
extrait de levure	3 g
DL- ζ ALA	2 g
agar	12 g
eau distillée	1000 cc
pH 7,2	

Couler en tubes inclinés.

Révéler au $\text{Cl}_3 \text{Fe}$ à 10 %

AMIDON (20)

Nutrient broth DIFCO	8 g
amidon soluble	10 g
agar	10 g
eau distillée	1000 cc
Couler en boîtes de Petri.	
Ensemencer en spots.	

C X (22) Oshira modifié

$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1 g
$\text{Mg SO}_4 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
extrait de levure	0,1 g
tampon $\text{PO}_4 \text{M}$	10 ml
Carboxyméthylcellulose	40 g
agar	3 g
eau distillée	1000 cc
Couler en boîtes de Petri.	
Ensemencer en spots.	

PECTINE PRUNIER (22)

A :

$\text{Cl}_2 \text{ Ca}$ 5 g
 gélose 15 g
 eau distillée 1000 cc
 Répartir 3 ml par tube.

B :

extrait de levure 2 g
 bactopeptone 3 g
 pectine rouge 5 g
 éthanol à 95° 10 ml
 eau distillée 1000 cc

pH 7

Recouvrir au moment de l'emploi les culots A de 1,5 ml de la préparation B, ensemer en même temps.

Hd (20)

eau distillée à 80° C 1000 cc
 BBT à 1,6 % 1 cc
 $\text{CaCl}_2 \text{ H}_2\text{O}$ à 10 % 6 cc
 Polypectate de Na 22 g

A : ajuster le pH à 4,5 - 4,7 (jaune) avec HCl N - Autoclaver.

B : ajuster le pH à 6,9 - 7,1 (vert) avec NaOH N - Autoclaver.

C : autoclaver - Ajuster le pH à 8,3 - 8,5 avec NaOH N stérile.

Ajouter une solution d'agar à 4 % (100 ml).

Couler en boîtes de Petri.

Ensemencer en spots.

ANNEXE IV

TESTS DIVERS

LAIT (20)

10 % de lait écrémé stérile dans le milieu Y N A (0,5 % d'extrait de levure dans le Nutrient agar DIFCO)

Couler en boîtes de Petri.

Ensemencer en nappe.

T W E (22)

$\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$ 0,5 g

K_2HPO_4 0,5 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g

NaCl 5 g

extrait de levure 5 g

TWEEN 80 1 g

agar 16 g

eau distillée 1000 cc

Couler en boîtes de Petri.

Ensemencer en spots.

$\text{H}_2 \text{S}$ (22)

$\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$ 0,5 g

K_2HPO_4 0,5 g

MgSO_4 0,2 g

NaCl 5 g

extrait de levure 5 g

bactopeptone 0,5 g

Cystéine 0,1 g

Répartir en tubes (1 ml) à hémolyse.

Ensemencer et disposer une bandelette de papier filtre imprégné de sous-acétate de plomb descendant à 0,5 cm du niveau du liquide et maintenu par le bouchon.

ANNEXE V

PROTOCOLE D'OBTENTION DE SERUMS DE LAPIN ANTIBACTERIENS

Préparation de l'Ag :

Une suspension en eau physiologique tamponnée est faite à partir d'une culture sur TTC + de 24 h en ne choisissant que des colonies virulentes.

Le nombre de bactéries par ml de suspension est donné par la relation graphique établie par FROSSARD (planche V) selon la technique de McFARLAND (47) contrôlée par l'étalement des dilutions sur boîtes de Petri et comptage (26, 56). Le nombre de 10^8 a été choisi pour les suspensions des souches 1810, T0₃, Au1a, Ge31, Ba₁, Ba₉.

Les suspensions sont ensuite maintenues 1 h au bain-marie bouillant afin d'éliminer l'Ag H flagellaire (CLEYET-MAREL com. pers.).

La suspension de la souche Pd1 est réalisée en eau stérile. De l'ordre de 10^9 bact./ml, elle n'a pas subi de passage au bain-marie.

Immunisation des lapins :

La race albinos néo-zélandaise a été retenue pour la qualité de son sérum. Nous avons immunisé 1 lapin par souche bactérienne sauf pour Pd1 (2 lapins). Ces lapins, d'environ 1,500 kg, ont été contrôlés pendant la période de quarantaine comme ne possédant pas d'anticorps réagissant avec *P. solanacearum*.

Durant la première semaine, nous avons injecté dans la veine marginale de l'oreille 0,5 ml ; 1 ml et 1,5 ml de suspensions bactériennes.

Pendant la deuxième semaine, ont été injectés dans la marginale de l'oreille 2 ml ; 3 ml et 2 ml de suspensions bactériennes, cette dernière injection accompagnée d'une injection sous-cutanée de 2 ml.

Après une semaine de repos, il a été procédé à des rappels par injection sous-cutanée de 2 ml de suspension, une fois par semaine.

Au 2e rappel, nous avons récupéré le sang des lapins au niveau de la veine marginale de l'oreille (5 ml). Ce sang, placé à la température de 37° C pendant 2 h, puis au réfrigérateur toute la nuit, est centrifugé 15 mn à 4000 tours/mn. Nous avons ajouté du merthiolate à 0,1 % aux sérums après les avoir filtrés sur millipore 0,22 µm.

Une plus grande quantité du sérum de lapin anti Pd1 a été ainsi préparée (20 ml) pour la Station de l'IRAT à la Réunion.

ANNEXE VI

TECHNIQUE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE



Sur les lames pour immunofluorescence, on dépose 10 μ l d'une solution d'Antigène (10^8 bact./ml) par spot. On sèche à l'étuve à 32° C pendant 1 h 30. On fixe ensuite par passages dans la flamme d'un bec BUNSEN.

Le sérum de lapin est par ailleurs dilué au 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120, 1/10240, 1/20480. On dépose 10 μ l de chaque dilution sur chaque spot et on laisse en contact, en atmosphère humide, dans l'étuve à 32° C pendant 30 mn.

On rince deux fois 5 mn dans de l'eau physiologique tamponnée (pH 7,2).

On répartit le sérum fluorescent préparé extemporanément et on laisse en contact, en atmosphère humide, dans l'étuve à 32° C pendant 30 mn.

On rince deux fois 5 mn dans de l'eau physiologique tamponnée.

On dépose 2 gouttes de glycérine tamponnée et on recouvre d'une lamelle.

Toutes les dilutions se font en eau physiologique tamponnée.

①	②	③	④	⑤	
⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	

1 = Pd1	6 = Au1a
2 = 1810	7 = Ge31
3 = T0 ₁	8 = Ba ₁
4 = T0 ₃	9 = Ba ₉

5 et 10 = témoins

L'observation se fait au microscope à fluorescence avec un objectif de 40 à immersion.

On note aux différentes dilutions du sérum la présence de corps bactériens fluorescents jusqu'à celle où la fluorescence s'éteint : c'est le titre de la précipitation (dilution de l'antisérum).

ANNEXE VII

RECHERCHE DE BACTERIOPHAGES DANS LE SOL

. Ensemencer 2 ml de bouillon nutritif DIFCO (8 g/l) avec la bactérie, agiter 3 à 12 h à 32° C.

. Prélever la terre et la mouiller avec le bouillon nutritif, brasser et filtrer d'abord grossièrement puis finement sur millipore. Le filtrat final est recueilli directement sur les tubes ensemencés dans le rapport 1/1. On peut éventuellement centrifuger le bouillon de terre avant la dernière filtration.

. Laisser en contact de 6 à 12 h.

. Réaliser des nappes avec ce bouillon sur un milieu approprié. Le milieu de KING B a été retenu pour ses qualités : vitesse de croissance de la bactérie légèrement ralentie, bonne hydratation, lecture facile des plages de lyse.

. Observer les plages de lyse après 24 h d'incubation, les prélever et les mettre dans le milieu nutritif ensemencé, agiter 3 à 12 h à 32° C : 1er enrichissement. Parallèlement à l'enrichissement, on réalise 1 témoin pour différencier le processus de lyse de la croissance bactérienne. On apprécie la diminution du trouble par rapport à ce témoin.

. Le deuxième enrichissement se fait en mélangeant en proportions égales la suspension phagique du 1er enrichissement (récupérée par centrifugation, 20 mn à 5000 t/mn, et filtration sur membrane millipore 0,22 µm) et la suspension bactérienne dosée à 10^8 bactéries/ml dans du bouillon nutritif. Effectuer ainsi le nombre nécessaire d'enrichissements successifs en laissant le moins de temps possible s'écouler entre chaque afin d'éviter le développement de mutants résistants aux phages.

. L'enrichissement est convenable lorsque le tube contient une suspension translucide par rapport au témoin ce qui représente environ 10^6 Unités Formant Plage/ml.

. Après vérification de la concentration du phage dans le filtrat et détermination de la dilution de routine, les suspensions phagiques sont congelées pour conservation.



Pd1



1810



Pd41



Pd5



TO₁



TO₂



TO₃



TO₄



TO₅



Au1a



Au2



Ge1a



Ge31



Ba₁



Ba₃



Ba₅



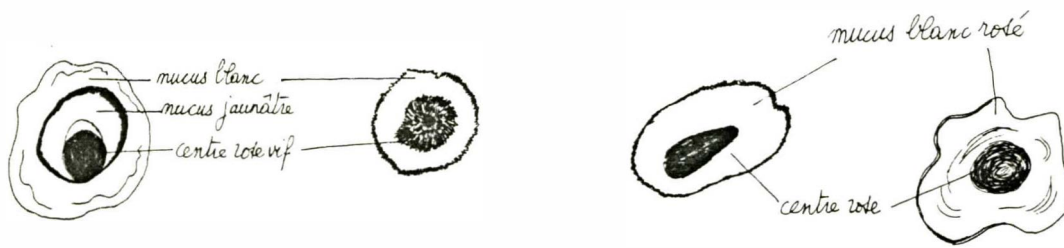
Ba₇



Ba₉

PLANCHE I

Aspect des colonies sur TTC + après 12 h d'incubation à $32^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$:
dômes translucides plus ou moins bombés.



Pd1

1810

colonie très petite

Pd41

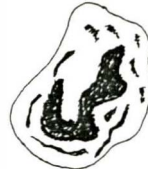
Pd5



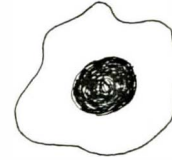
TO₁



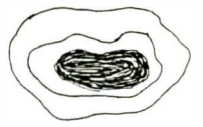
TO₂



TO₃



TO₄

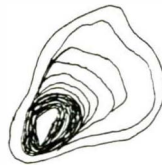


TO₅

Colonies à centre rose foncé, mucus blanc rosé.



Au1a



Au2



Ge1a



Ge31

bord denté

Colonies à centre rose, mucus blanc marbré de rose.



Ba₁



Ba₃



Ba₅



Ba₇



Ba₉

colonie très petite

Colonies à centre rouge, mucus blanc rosé.

PLANCHE II

Aspect des colonies sur TTC + après 24 h d'incubation à 32° C ± 0,5° C

On remarquera l'homogénéité de l'aspect cultural des souches Ba₁ à Ba₉ (race 2) auxquelles s'apparente Ge31 (race 1, biovar IV) ainsi que l'aspect particulier de 1810 (race 3).



Pd1



1810



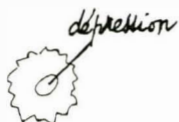
Pd41



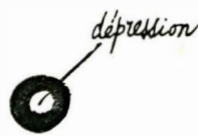
Pd5



TO₁



TO₂



TO₃



TO₄



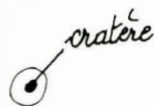
TO₅



Au1a



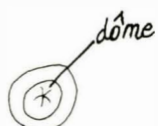
Au2



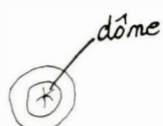
Ge1a



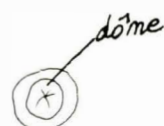
Ge31



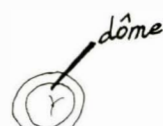
Ba₁



Ba₃



Ba₅



Ba₇



Ba₉

très petite colonie

PLANCHE III

Aspect des colonies sur KING B après 48 h d'incubation à $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$:

On remarquera l'homogénéité de l'aspect cultural des souches Ba₁ à Ba₉ (race 2) par rapport à la variabilité de celui des autres souches (races 1 et 3 : 1810).

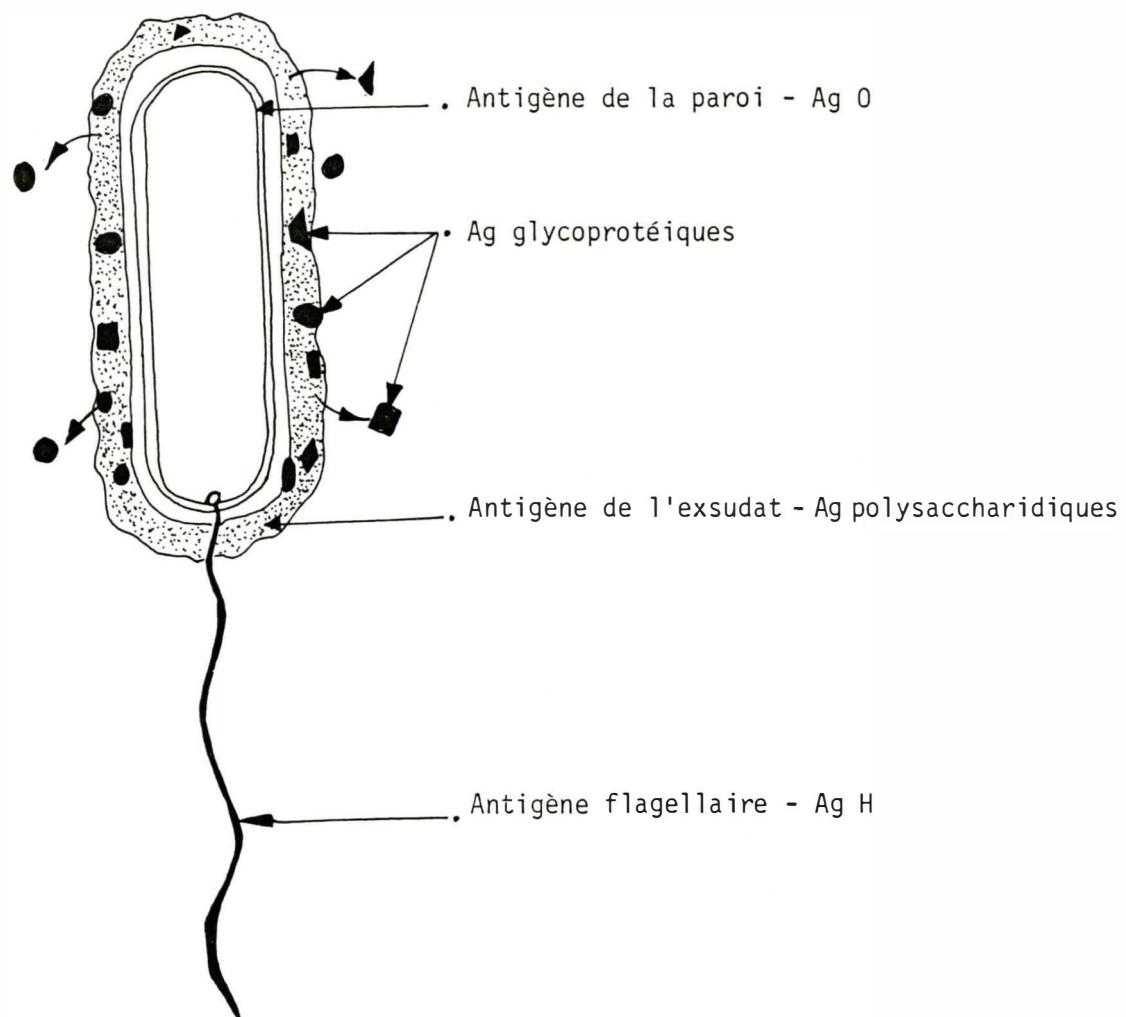
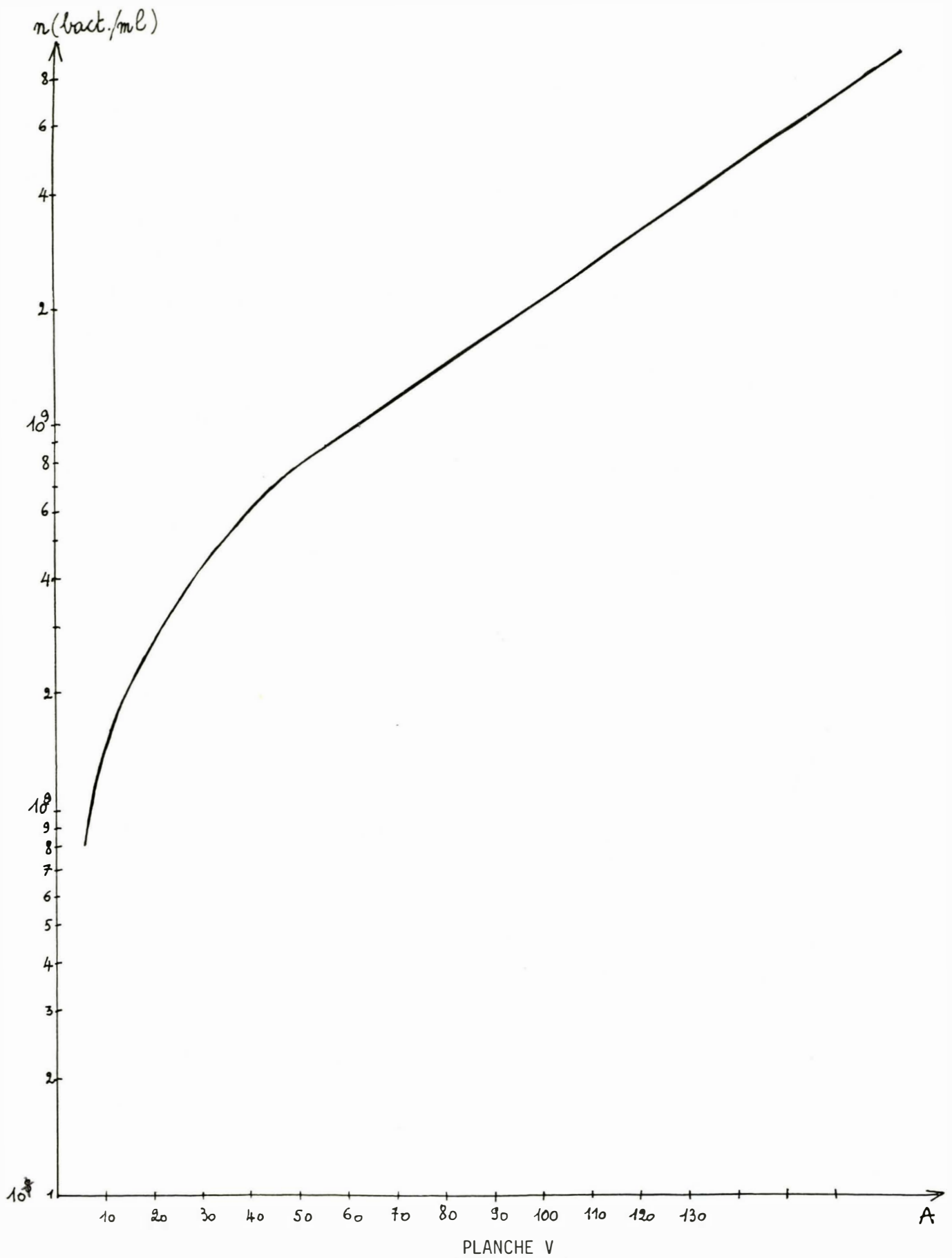


PLANCHE IV

Antigènes de *P. solanacearum*
d'après DIGAT-CAMBRAL 1976 (17)



Graphe donnant l'Absorbance (A) d'une suspension bactérienne en eau distillée en fonction du nombre de bactéries (n) par ml de suspension.
d'après FROSSARD 1982

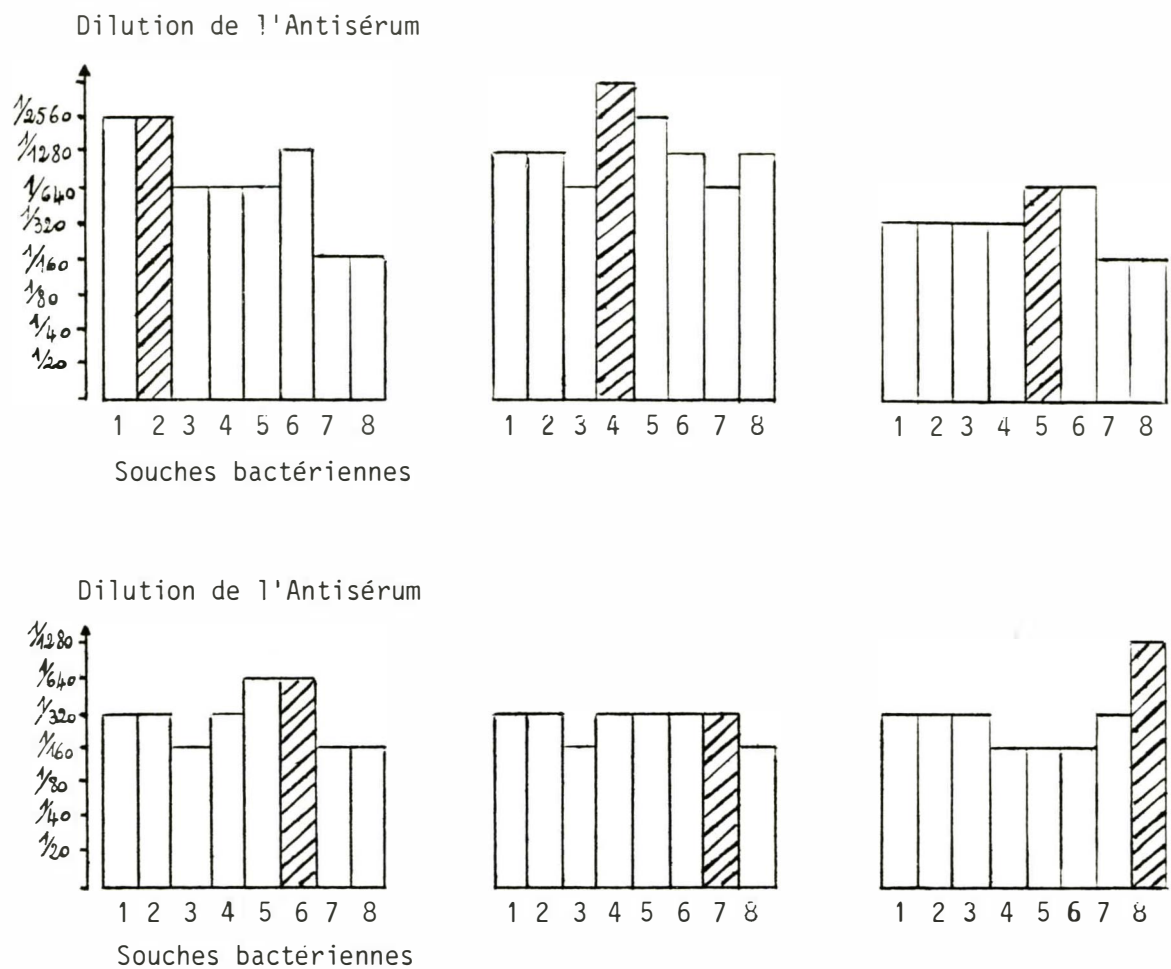


PLANCHE VI

Etude comparée par la technique de l'immunofluorescence indirecte
des propriétés sérologiques de :

- 1 = Pd1
- 2 = 1810
- 3 = T0₁
- 4 = T0₃
- 5 = Au1a
- 6 = Ge31
- 7 = Ba₁
- 8 = Ba₉

= souche homologue au sérum

TABLEAU I
SOUCHES DE *P. SOLANACEARUM* ETUDIEES

N° LABO	HOTE	TERRITOIRE D'ORIGINE	ISOLEE PAR	EN
Pd 1	pomme de terre	Colimaçon - LA REUNION moyenne altitude	P. FROSSARD	mars 82
Pd 4 1	pomme de terre	Piton St Leu - La Plate - LA REUNION moyenne altitude	GIRARD	déc. 82
1810	pomme de terre	HAÏTI altitude	collection d'ANGERS - INRA	
Pd 5	pomme de terre	Trois Bassins - LA REUNION M. POUGARI	GIRARD	avril 83
TO 1	tomate	Mon Caprice - St Pierre LA REUNION	id.	avril 82
TO 2	id.	id.	id.	janvier 83
TO 3	id.	La Bretagne - St Denis LA REUNION	id.	janvier 83
TO 4	id.	CERF La Bretagne LA REUNION	id.	avril 83
TO 5	id.	IRAT Colimaçon LA REUNION	id.	avril 83
Au 1a	aubergine	Mon Caprice - St Pierre LA REUNION	id.	avril 82
Au 2	id.	IRAT Colimaçon LA REUNION	id.	avril 83
Ge 1a	géranium rosat	Chaloupe - St Leu LA REUNION	id.	déc. 82
Ge 3 ₁	id.	id.	id.	déc. 82
Ba 1	bluggoe (hampe)	GRENADE	P. FROSSARD	oct. 81
Ba 3	bananier (rachis)	id.	id.	oct. 81
Ba 5	bananier (rachis)	id.	id.	oct. 81
Ba 7	bananier (pédoncule fruit)	id.	id.	oct. 81
Ba 9	bananier	HAÏTI	VERNET	?

TABLEAU II bis

DIFFERENCIATION DE *P. SOLANACEARUM* EN BIOVARS
D'APRES HAYWARD (30)

BIOVARS CARACTERES										II	III	IV
	A	B	C	D	I E	F	G	H	I			
Oxydation du :												
Glucose					+					+	+	+
Saccharose					+					+	+	+
Lactose					-					+	+	-
Maltose					-					+	+	-
Cellobiose					-					+	+	-
Mannitol					-					-	+	+
Sorbitol					-					-	+	+
Dulcitol					-					-	+	+
Hippurate	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Malonate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Inositol	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Tréhalose	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Lactate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Dénitrification	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Tyrosinase	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
TWE	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
TRP	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+

+ = possède le caractère
- = ne possède pas le caractère

TABLEAU II

DIFFERENCIATION DES SOUCHES EN BIOVARS SUR LA BASE DE L'UTILISATION DE COMPOSES HYDROCARBONES CONTENUS DANS UN MILIEU

SYNTHETIQUE (ARJ) - LECTURE FAITE ENTRE 15 ET 21 JOURS.

SOUCHES UTILISATION DU	Pd1	1810	Pd41	Pd5	TO ₁	TO ₂	TO ₃	TO ₄	TO ₅	Au1a	Au2	Ge1a	Ge3 ₁	Ba ₁	Ba ₃	Ba ₅	Ba ₇	Ba ₉
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Maltose	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Cellobiose	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
Mannitol	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
Sorbitol	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
Dulcitol	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
Tryptophane	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hippurate	0	-	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	-	-	-	-	-
Malonate	-	0	-	0	-	0	0	0	0	-	0	-	-	0	0	0	0	0
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0
Trehalose	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
Lactate	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0
Salicine	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-	0	-	-	0	0	0	0	0
Esculine	-	-	-	+	+	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inuline	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0
Galactose	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARJ	x	0	x	x	x	0	x	x	x	x	x	x	x	x	0	x	0	x
Biotypes	III	II	IV	III	III	III	III	III	III	III	III	IV	IV	I _E	I _E	I _E	I _E	I _E

x virage léger de l'indicateur coloré vers les pH acides (jaune)
 + oxydation de la source de carbone (production d'acides), coloration jaune diffusant dans le milieu
 0 germe indifférent, croissance sans modification de pH (vert)
 - alcalinisation du milieu, coloration bleue diffusant dans le milieu.

TABLEAU 111

PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES SOUCHES.

SOUCHE	Pd1	1810	Pd41	Pd5	TO ₁	TO ₂	TO ₃	TO ₄	TO ₅	Au1a	Au2	Ge1a	Ge31	Ba ₁	Ba ₃	Ba ₅	Ba ₇	Ba ₉	LECTURE A
GRAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
cytochrome oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
catalase	+	+	++	++	++	x	+	++	++	+	++	+	+	++	+	+	++	+	
nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
métabolisme	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	ox	2 j
production d'H ₂ S à partir de la CYST	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-	+/-	-	-	-	+	-	10 j
dénitrification	+	(+)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
en x jours	5	4	4		4	4	2	2	2	2	2	4	4				8		
tyrosinase	+	x	++	+	++	+	+	++	++	++	++	+++	x	++	+++	+	+	++	8 j
hydrolyse TWEEN 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	15 j
hydrolyse amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8 j
utilisation caséine du lait	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	++	++	+	10 j
hydrolyse gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8 j
production d'indole sur ALMT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	8 j
production d'indole sur URE F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2 j
T D A	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 j
URE D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4 j
URE F	+++	-	+/-	+	+	+++	+	+	+	++	++	+++	+/-	++	-	++	++	++	10 j
URE C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
en x jours	6	12	12	6	6	12	12	4	6	6	6	6	12	8	8	8	8	4	
croissance sur CS	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	8 j
croissance sur NaCl 0,5	+++	+/-	+	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+	++	++	+++	8 j
NaCl 1	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	8 j
NaCl 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8 j
inclusion de F80H B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8 j
L-ARG dihydrolase	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	8 j
O D C (Taylor)	++	-	++	++	++	++	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	1 j
L D C (Taylor)	+	-	+	+	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	1 j
M61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 j
A R G / M61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 j
L Y S / M61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 j
O R N / M61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 j
L-5 ALA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8 j
DN ase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8 j
CX :																			
diamètre cuvette en mm	22	20	20	12	16	13	17	17	25	15	12	20	20	39	40	38	38	36	8 j
Hd A :																			
diamètre cuvette en mm	7	10	20	10	6	15	13	11	8	15	7	7	10	7	8	8	10	11	} 15 j
virage pH neutre	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	
Hd B :																			
diamètre cuvette en mm	25	10	16	9	26	27	26	8	12	25	9	23	26	8	9	9	11	8	} 15 j
virage pH alcalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hd C :	18	8	15	8	20	20	18	9	10	20	8	18	16	8	9	9	10	8	15 j
Pectine Prunier	0	0	+	+/-	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+/-	+	+	+	++	24 j

x souche peu active
 + active
 ++ moyennement active
 +++ très active
 0 croissance, pas d'activité enzymatique
 - souche inactive
 +/- activité douteuse

TABLEAU 14

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES. DISQUES BIO MERIEUX.

<div>SOUCHES</div> <div>ANTIBIOTIQUES</div> <div>Nom Charge en µg/ml</div>	Pd1	1810	Pd41	Pd5	TO ₁	TO ₂	TO ₃	TO ₄	TO ₅	Au1a	Au2	Ge1a	Ge3 ₁	Ba ₁	Ba ₃	Ba ₅	Ba ₇	Ba ₉
Bacitracine 10 8/9 - 12/13	I	S	I	R	I	R	S	R	S	I	R	R	R	I	R	I	I	I
Streptomycine 10 11/12 - 14/15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomycine 30 9/10 - 11/12	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R
Oleandomycine 15 11/12 - 16/17	S	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
Tetracycline 30 14/15 - 18/19	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Auréomycine 30 13/14 - 17/18	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lincomycine 2 12/13 - 17/18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Pénicilline G 10 9/10 - 14/15	I	I	I	R	R	R	I	R	I	R	I	I	R	I	I	I	I	I
Chloramphenicol 30 14/15 - 18/19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kanamycine 30 12/13 - 29/30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Légende : exemple BACITRACINE à 10 µg/ml d : 8/9-12/13

d est la distance en mm du bord extérieur du disque d'antibiotique à la limite de la zone d'inhibition.

d < 8 germe résistant R

9 < d < 12 germe intermédiaire I

d > 13 germe sensible S

TABLEAU IV bis

RELATION DES BIOVARS VIS-A-VIS DE 4 ANTIBIOTIQUES

ANTIBIOTIQUE \ BIOVAR	I	II	III	IV
B ₁₀	4 I 1 R	1 S	2 S 3 I 4 R	1 I 2 R
OL ₁₅	5 S	1 R	8 S 1 R	2 I 1 S
Va ₃₀	1 I 4 R	1 R	2 I 7 R	3 R
P ₁₀	5 I	1 I	4 I 5 R	2 I 1 R

S : souche sensible

Légende : I : " intermédiaire

R : " résistante

TABLEAU V

TEST D'INOCULATION DE *SOLANUM TUBEROSUM* L. c.v. STERLING.

SOUCHE INOCULEE t (EN JOURS)	Pd1	1810	Pd41	TO ₁	TO ₂	TO ₃	Au1a	Ge1a	Ge31	Ba ₁	Ba ₃	Ba ₅	Ba ₇	Ba ₉
to + 17	000	000	111	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
+ 19	"	"	112	"	"	"	"	100	"	"	"	"	"	"
+ 21	"	"	223	"	"	"	"	110	"	"	"	"	"	"
+ 23	"	"	233	"	"	"	"	210	"	"	"	"	"	"
+ 25	"	"	333	"	"	"	"	320	"	"	"	"	"	"
+ 27	"	"	344	"	"	"	"	430	"	"	"	"	"	"
+ 29	"	"	444	"	"	"	"	430	"	"	"	000	001	000
+ 31	000	000	555	"	"	"	"	530	000	010	"	110	102	001
+ 33	111	111		000	000	000	000	41	101	120	000	120	112	111
+ 35	111	222		001	001	111	011	41	112	131	101	131	112	111
+ 37	122	233		001	001	112	011	52	122	131	101	131	112	111
+ 39	232	343		001	011	112	022	3	122	132	212	131	112	111
+ 41	333	444		001	011	122	022	3	122	132	212	131	112	111
+ 43	344	445		011	111	122	022	4	133	132	212	131	112	111
+ 45	444	555		111	111	122	022	5	134	132	212	131	112	111
+ 47	555			111	111	122	022		134	132	212	131	112	111

9 témoins : 3 sans aucun traitement

3 piqués

3 piqués avec de l'eau distillée stérile.

Echelle de 0 à 5 selon WINSTEAD et KELMAN.

to : inoculation

t : temps

TABLEAU VI
TEST D'INOCULATION DE *LYCOPERSICUM ESCULENTUM* L. c v. HYBRIDE
DE 1e GENERATION JAVA

SOUCHE INOCULEE t (EN JOURS)	Pd1	1810	Pd4	TO ₁	TO ₂	TO ₃	Au1a	Ge1a	Ge31	Ba ₁	Ba ₃	Ba ₅	Ba ₇	Ba ₉
to + 3	012	000	000	001	011	111	212	000	012	001	000	000	000	000
+ 6	133	111	000	112	122	333	424	111	123	112	111	111	111	111
+ 9	244	222	000	124	333	444	534	111	123	112	111	111	111	111
+ 12	355	333	001	235	543	554	535	111	124	112	111	111	111	111
+ 15	3..	333	001	34.	.44	..4	.3.	111	124	112	111	111	111	111
+ 18	3..	333	001	54.	.44	..5	.3.	111	124	112	111	111	111	111
+ 21	4..	333	001	.4.	.44		.4.	111	124	112	111	111	111	111
+ 24	4..	333	001	.5.	.54		.4.	111	125	212	111	111	111	111
+ 27	5..	333	012		..4		.4.	221	22.	212	111	221	111	111
+ 30	5..	333	122		..5		.5.	221	32.	312	222	322	222	222
+ 33		333	122					321	33.	422	222	322	222	222
+ 36		333	222					321	33.	523	222	322	222	322
+ 39		333	232					321	33.	.23	222	322	222	322
+ 42		333	242					321	33.	.33	222	322	222	322
+ 45		333	242					321	33.	.33	222	322	222	322

9 témoins : 3 sans aucun traitement
3 piqués
3 piqués avec de l'eau distillée stérile.

Echelle de 0 à 5 selon WINSTEAD et KELMAN

to : inoculation

t : temps

TABLEAU VII

TEST D'INOCULATION DE *LYCOPERSICUM ESCULENTUM* MILL. c v. MERVEILLE DES MARCHES

SOUCHE INOCULEE t (EN JOURS)	Pd1	1810	Pd41	TO ₁	TO ₂	TO ₃	Au1a	Ge1a	Ge31	Ba ₁	Ba ₃	Ba ₅	Ba ₇	Ba ₉
to + 3	012	011	000	012	232	232	012	012	012	000	000	000	000	000
+ 6	122	132	323	122	343	343	122	122	122	000	000	000	010	000
+ 9	344	244	444	333	455	455	344	344	344	010	000	000	110	000
+ 12	555	355	555	443	5	5	555	555	555	011	000	000	110	001
+ 15		3		444						011	010	000	110	002
+ 18		4		444						012	020	000	110	003
+ 21		4		554						013	030	000	110	004
+ 24		5		5						024	040	001	110	005
+ 27										055	050	002	110	00
+ 30										2	0.1	003	110	00
+ 33										3	0.2	104	110	00
+ 36										4	0.3	205	110	01
+ 39										5	0.4	30	110	02
+ 42											0.5	40	110	14
+ 45												50	110	15

9 témoins : 3 sans aucun traitement
 3 piqués
 3 piqués avec de l'eau distillée stérile.

Echelle de 0 à 5 selon WINSTEAD et KELMAN

to : inoculation

t : temps

TABLEAU VIII

TEST D'INOCULATION DE SOLANUM MELONGENA L. c.v. VIOLETTE LONGUE HATIVE

SOUCHE INOCULEE t (EN JOURS)	Pd1	1810	Pd41	TO ₁	TO ₂	TO ₃	Au1a	Ge1a	Ge31	Ba ₁	Ba ₃	Ba ₅	Ba ₇	Ba ₉
to + 3	012	022	000	011	000	100	000	021	102	120	210	111	023	111
+ 6	223	133	111	232	223	323	232	232	213	231	322	232	124	323
+ 9	344	244	121	343	443	434	344	443	324	342	434	444	245	434
+ 12	555	355	222	443	554	555	445	553	345	353	555	555	35	555
+ 15		3	222	443	4		44	3	34	3.3			3	
+ 18		3	323	454	4		44	3	34	4.3			4	
+ 21		4	323	4.4	5		55	4	45	4.4			4	
+ 24		5	434	5.5				4	4	5.4			5	
+ 27			445					4	4	4				
+ 30			55					5	4	5				
+ 33									5					
+ 36														
+ 39														
+ 42														
+ 45														

9 témoins : 3 sans aucun traitement
 3 piqués
 3 piqués avec de l'eau distillée stérile.
 Echelle de 0 à 5 selon WINSTEAD et KELMAN
 to : inoculation
 t : temps

TABLEAU IX

TEST D'INOCULATION DE CAPSICUM ANNUUM L. c v. CARRE DOUX EXTRA HATIF

SOUCHE INOCULEE t (EN JOURS)	Pd1	1810	Pd41	TO ₁	TO ₂	TO ₃	Au1a	Ge1a	Ge31	Ba ₁	Ba ₃	Ba ₅	Ba ₇	Ba ₉
to + 3	000	000	000	000	000	001	000	000	000	000	000	000	000	000
+ 6	001	000	000	011	000	213	000	000	000	000	000	000	000	000
+ 9	012	000	000	122	000	324	000	110	000	000	000	000	000	000
+ 12	013	000	000	233	001	445	000	120	100	000	000	000	000	100
+ 15	013	000	000	333	102	44	122	230	100	000	000	000	000	100
+ 18	114	000	000	444	202	44	234	340	200	000	000	000	000	111
+ 21	114	000	000	544	303	54	445	441	300	000	011	000	000	111
+ 24	215	010	000	55	403	5	555	553	501	000	021	000	000	111
+ 27	42	020	110		505			4	11	100	131	000	100	121
+ 30	44	141	231		1			5	22	101	242	111	210	121
+ 33	55	252	342		1				34	121	343	232	222	121
+ 36		3.3	443		2				45	232	453	343	334	121
+ 39		4.3	454		2				5	343	4.4	444	444	333
+ 42		4.4	5.4		3					444	5.4	555	455	444
+ 45		5.5	5		4					555	5		5	555

9 témoins : 3 sans aucun traitement

3 piqués

3 piqués avec de l'eau distillée stérile.

Echelle de 0 à 5 selon WINSTEAD et KELMAN

to : inoculation

t : temps

TABLEAU X

TEST D'INFILTRATION DE FEUILLES DE *NICOTIANA TABACUM* L.
CULTIVAR SAMSUN NN.

SOUCHE INFILTREE	CHARGE INOCULUM (en bact./ml)	REACTION A 5 JOURS	RACE OU PATHOVAR
Pd1	$1,1 \cdot 10^9$	N halo très important	1
1810	$1,1 \cdot 10^9$	Y chlorose	3
Pd41	10^9	N halo moyen	1
Pd5	$1,2 \cdot 10^9$	N halo important	1
T0 ₁	$1,25 \cdot 10^9$	N halo faible puis moyen	1
T0 ₂	$1,3 \cdot 10^9$	N'/N halo très faible	1
T0 ₃	$0,75 \cdot 10^9$	N'	1
T0 ₄	$0,75 \cdot 10^9$	N léger halo	1
T0 ₅	$0,64 \cdot 10^9$	N halo important	1
Au1a	$0,87 \cdot 10^9$	N halo moyen puis important	1
Au2	10^9	N halo moyen	1
Ge1a	10^9	N'/N halo très faible	1
Ge31	$0,84 \cdot 10^9$	N' puis N, halo de + en + important	1
Ba ₁	$0,52 \cdot 10^9$	HR	2
Ba ₃	$0,76 \cdot 10^9$	HR/N	2 ?
Ba ₅	$1,04 \cdot 10^9$	HR	2
Ba ₇	$1,1 \cdot 10^9$	HR	2
Ba ₉	$0,8 \cdot 10^9$	HR	2

NOTATION SELON LOZANO ET SEQUEIRA

N = nécrose avec halo chlorotique

N' = " sans " "

Y = jaunissement sans nécrose

HR = réaction d'hypersensibilité.

TABLEAU XI

TEST D'INFILTRATION DE COTYLEDONS DE *GOSYPPIUM SP.*

SOUCHE INFILTRÉE CULTIVAR	Pd1	1810	Pd41	Pd5	TO ₁	TO ₂	TO ₃	TO ₄	TO ₅	Au1a	Au2	Ge1a	Ge31	Ba ₁	Ba ₃	Ba ₅	Ba ₇	Ba9
HAR L299 ⁻¹⁰ SENSIBLE																		
to + 3	444	222	444	444	444	000	444	444	444	444	444	333	111	111	000	000	000	000
+ 6	555	543	555	544	556	chlorose	666	666	666	665	664	544	666	666	555	555	555	555
+ 9	776	553	777	666	776	777	776	776	776	766	777	744	777	777	777	777	777	777
feuilles développées à to + 12 (nombre)	220	223	322	000	220	223	330	230	220	200	322	232	422	242	232	432	243	332
REBA B 50 RESISTANT																		
to + 3	444	111	333	444	333	000	333	444	444	444	444	222	111	222	111	000	000	444
+ 6	544	543	544	555	554	chlorose	666	666	666	665	555	555	533	554	555	555	533	555
+ 9	777	665	777	776	776	777	776	776	776	776	766	777	777	777	777	777	777	777
feuilles développées à to + 12 (nombre)	222	212	222	330	130	223	320	230	320	320	300	223	222	222	123	123	323	221

9 témoins : 3 sans aucun traitement
 3 piqués
 3 piqués avec de l'eau distillée stérile.

Légende : 0 = pas de symptôme
 1 = nécrose au point d'infiltration
 2 = nécrose en petites plaques
 3 = nécrose en grandes plaques
 4 = nécrose étendue à tout le cotylédon
 5 = cotylédon tombé
 6 = flétrissement de la plantule et du cotylédon sain
 7 = plantule vigoureuse en croissance.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - AVERRE C.W. III and KELMAN A., 1964. Severity of bacterial wilt as influenced by ratio of virulent to avirulent cells of Pseudomonas solanacearum in inoculum. Phytopath. 54, 779-783.
- 2 - BERGEY'S manual of determinative bacteriology, 1974. Eight edition. Ed Williams-Wilkins, Baltimore, p. 230-232.
- 3 - BOISTARD P., BOUCHER C. et MESSAGE B., 1976. Approaches to a genetical study of interactions between Pseudomonas solanacearum and its hosts. Proc. 1th. Int. Conf. Ecol. Control Bact. Wilt - Raleigh, 22-29.
- 4 - BRADBURY J.F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path. 49(5), 213-218.
- 5 - BUDDENHAGEN I.W., 1960. Strains of Pseudomonas solanacearum in indigenous hosts in banana plantations of Costa-Rica, and their relationship to bacterial wilt of bananas. Phytopath. 50, 660-664.
- 6 - BUDDENHAGEN I.W., SEQUEIRA L. and KELMAN A., 1962. Designation of races in Pseudomonas solanacearum. Phytopath. 52, 726.
- 7 - BUDDENHAGEN I.W. and KELMAN A., 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum. Ann. Rev. Phytopath. 2, 203-230.
- 8 - COLENO A., Le NORMAND M. et BARZIC M.R., 1971. A qualitative study on the antigens involved in the complement-fixation reaction among phytopathogenic pseudomonads. Proc. 3rd Int. Conf. Plant Path. Bact. Wageningen, 143-150.
- 9 - COLENO A., 1973. Contribution à l'étude taxonomique de quelques Pseudomonas phytopathogènes. Thèse Doct. ès Sciences CNRS AO 8556.
- 10 - COLENO A. et RIDE M., 1973. Serology of phytopathogenic bacteria. Third Int. Congress of Plant Path. Abstract, 323.
- 11 - COLENO A., HINGAND L. et RAT B., 1976. Some aspects of the serology of Pseudomonas solanacearum E.F. Smith. Cf. n° 3, 110-119.
- 12 - CUPPELS D., 1976. Bacteriocin production by Pseudomonas solanacearum. Cf. n° 3, 120.

- 13 - CUPPELS D.A., HANSON R.S. and KELMAN A., 1978. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by Pseudomonas solanacearum. J. Gen. Microbiol. 109, 295-303.
- 14 - DIGAT B., 1966. Rétablissement chez la tomate infectée par le Pseudomonas solanacearum E.F. Sm. C.R. Acad. Agric. France, 1005-1009.
- 15 - DIGAT B., 1971. The significance of catalase activity in Pseudomonas solanacearum. Cf. réf. n° 8., 71-75.
- 16 - DIGAT B. et CAMBRAL M., 1976. Specificity of antigens in Pseudomonas solanacearum E.F. Smith and application of serology for studying bacterial wilt. Cf. réf. n° 3, 38-57.
- 17 - DIGAT B. et ESCUDIE A., 1967. Reconnaissance du flétrissement bactérien des solanées aux Antilles Françaises. Phytiatrie-Phytopharma. 16, 187-197.
- 18 - DYE D.W., BRADBURY J.F., GOTO M., HAYWARD A.C., LELLIOTT R.A. and SCHROTH M.N., 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. Rev. Pl. Path. 59(4), 153-168.
- 19 - FRENCH E.R. and SEQUEIRA L., 1970. Strains of Pseudomonas solanacearum from Central and South Africa : a comparative study. Phytopath. 60, 506-512.
- 20 - FROSSARD P., 1983. Cahier des milieux du Laboratoire de Phytobactériologie du G.E.R.D.A.T.
- 21 - FUERST J.A. and HAYWARD A.C., 1969. Surface appendages similar to fimbriae (Pili) on Pseudomonas species. J. Gen. Microbiol. 58, 227-237.
- 22 - GARDAN L. et LUISETTI J., 1983. Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes. I.N.R.A. - Angers. Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie.
- 23 - GRANADA G.A. and SEQUEIRA L., 1975. Characteristics of Colombian Isolates of Pseudomonas solanacearum from tobacco. Phytopath. 65, 1004-1009.
- 24 - GRANADA G.A. and SEQUEIRA L., 1981. A selective medium for Pseudomonas solanacearum. Phytopath. 71 (2), 220.
- 25 - HARRIS D.C., 1971. Intra-specific variation in Pseudomonas solanacearum. Cf. réf. n° 8, 289-292.
- 26 - HARRIS D.C., 1976. Media for estimating a strain of Pseudomonas solanacearum in Kenyan soils by the dilution plate technique. Cf. réf. n° 3, 148-149.

- 27 - HAYWARD A.C., 1960. A method for characterizing Pseudomonas solanacearum. Nature, 186, 405-406.
- 28 - HAYWARD A.C., 1964. Characteristics of Pseudomonas solanacearum. J. Appl. Bacteriol. 27(2), 265-277.
- 29 - HAYWARD A.C. and WATERSTON J.M., 1964. Description of pathogenic fungi and bacteria n° 15 : Pseudomonas solanacearum. C.M.I.
- 30 - HAYWARD A.C., 1976. Systematics and relationships of Pseudomonas solanacearum. Cf. n° 3, 6-21.
- 31 - HAYWARD A.C., 1976. Some techniques of importance in the identification of Pseudomonas solanacearum. Cf. n° 3, 137-142.
- 32 - HILDEBRAND D.C., 1971. Pectate and pectine gels for differentiation of Pseudomonas sp. and other bacterial plant pathogens. Phytopath. 61, 1430-1436.
- 33 - HILDEBRAND D.C., 1971. Pectolytic enzymes of Pseudomonas. Cf. n° 8, 331-343.
- 34 - HUGH R. and LEIFSON E., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J. Bacteriol. 66, 24-26.
- 35 - HUSAIN A. and KELMAN A., 1958. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of Pseudomonas solanacearum. Phytopath. 48, 155-164.
- 36 - HUSAIN A. and KELMAN A., 1958. The role of pectic and cellulosytic enzymes in pathogenesis by Pseudomonas solanacearum. Phytopath. 48, 377-387.
- 37 - JENKINS S.F. Jr, MORTON D.J. and DUKES P.D., 1967. Comparison of techniques for detection of Pseudomonas solanacearum in artificially infested soils. Phytopath. 57, 25-27.
- 38 - JENKINS S.F. Jr and KELMAN A., 1976. Techniques for the study of Pseudomonas solanacearum. Cf. n° 3, 143-147.
- 39 - KARGANILLA A.D. and BUDDENHAGEN I.W., 1972. Development of a selective medium for Pseudomonas solanacearum. Phytopath. 62, 1373-1376.
- 40 - KELMAN A., 1954. The relationship of pathogenicity in Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopath. 44, 693-695.
- 41 - KELMAN A. and PERSON L.H., 1961. Strains of Pseudomonas solanacearum differing in pathogenicity to tobacco and peanut. Phytopath. 51, 158-160.

- 42 - KELMAN A. and COWLING E.B., 1965. Cellulase of Pseudomonas solanacearum in relation to pathogenesis. Phytopath. 65, 148-155.
- 43 - KELMAN A. and HRUSCHKA J., 1971. Differences in motility between virulent and avirulent cells of Pseudomonas solanacearum. Cf. n° 8, 313-315.
- 44 - KELMAN A. and HRUSCHKA J., 1973. The role of motility and aerotaxis in the selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of Pseudomonas solanacearum. J. Gen. Microbiol. 76, 177-188.
- 45 - KELMAN A., 1976. Mission of the conference. Cf. n° 3, 1-5.
- 46 - KESHWALL R.L., 1977. On the inoculation techniques with bacterial wilt pathogen, Pseudomonas solanacearum. Ind. J. Mycol. and Pl. Path. 7(2), 153-154.
- 47 - KIRÁLI Z., KLEMENT Z., SOLYMOSY F. and VÖRÖS J., 1970. Methods in plant pathology. Ed. Akademiai Kiadó. Budapest.
- 48 - KOJIMA E.S. and BUDDENHAGEN I.W., 1972. Antigenic relationships of strains of Pseudomonas solanacearum. Phytopath. 62, 1035-1036.
- 49 - LEDERBERG J., 1948. Detection of fermentative variants with tetrazolium. J. Bacteriol. 56, 24-26.
- 50 - LEVINE H.B. and GARBER E.D., 1950. Detection of rough dissociants of Pasteurella pestis with tetrazolium chloride. J. Bacteriol. 60, 508.
- 51 - LOZANO J.C. and SEQUEIRA L., 1970. Differentiation of races of Pseudomonas solanacearum by a leaf infiltration technique. Phytopath. 60(5), 833-838.
- 52 - MEREDITH D.S., 1970. Major banana diseases : past and present status. Rev. Pl. Path. 49(11), 539-554.
- 53 - MORTON D.J., DUKES P.D. and JENKINS S.F. Jr, 1965. Serological identification of Pseudomonas solanacearum in four solanaceous hosts. Phytopath. 55, 1191-1193.
- 54 - MORTON D.J., DUKES P.D. and JENKINS S.F. Jr, 1965. Detection of Pseudomonas solanacearum in infested soils by serological techniques. Phytopath. 55, 1063 (APS).
- 55 - NESMITH W.C. and JENKINS S.F. Jr, 1976. Selective medium for isolation of Pseudomonas solanacearum from soil. Cf. n° 3, 121.

- 56 - NESMITH W.C. and JENKINS S.F. Jr, 1979. A selective medium for the isolation and quantification of Pseudomonas solanacearum from soil. Phytopath. 69(2), 182-185.
- 57 - OKABE N. and GOTO M., 1963. Bacteriophages of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopath. 1, 397-418.
- 58 - PALLERONI N.J. and DOUDOROFF M., 1971. Phenotypic characterization and desoxyribonucleic acid homologies of Pseudomonas solanacearum. J. Bacteriol. 107(3), 690-696.
- 59 - PALLERONI N.J. and DOUDOROFF M., 1972. Some properties and taxonomic subdivisions of the genus Pseudomonas. Ann. Rev. Phytopath. 8, 73-100.
- 60 - PRUNIER J.-P., 1967. Différenciation en types biochimiques de souches de Pseudomonas solanacearum (Smith) Smith. Phytiatrie-Phytopharma. 16, 199-204.
- 61 - SANDS D.C., SCHROTH M.N. and HILDERAND D.C., 1970. Taxonomy of Phytopathogenic Pseudomonads. J. Bacteriol. 101(1), 9-23.
- 62 - SCHROTH M.N. and HILDEBRAND D.C., 1971. Current taxonomic thinking on the genus Pseudomonas, with emphasis on the plant pathogens. Cf. n° 8, 261-267.
- 63 - SEELEY N.D. and PRIMROSE S.B., 1982. The isolation of bacteriophages from the environment. J. Appl. Bacteriol. 53, 1-17.
- 64 - SEQUEIRA L., 1958. Bacterial wilt of bananas : dissemination of the pathogen and control of the disease. Phytopath. 48, 64-68.
- 65 - SEQUEIRA L. and KELMAN A., 1962. The accumulation of growth substances in plants infected by Pseudomonas solanacearum. Phytopath. 52, 439-448.
- 66 - SEQUEIRA L., AIST S. and AINSLIE V., 1972. Prevention of the hypersensitive reaction in tobacco by proteinaceous constituents of Pseudomonas solanacearum. Phytopath. 62, 536-541.
- 67 - SEQUEIRA L., 1976. Specificity in the infection of plant hosts by Pseudomonas solanacearum. Cf. n° 3, 63-67.
- 68 - STANIER R.Y., PALLERONI N.J. and DOUDOROFF M., 1966. The aerobic pseudomonads : a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43, 159-271.
- 69 - STARR M.P., STOLP H., TRÜPER H.G., BALOWS A. [et al.], 1981. The prokaryotes : a handbook on habitats, isolation, and identification of Bacteria. Ed. Springer-Verlag.

- 70 - THURSTON H.D., 1976. Resistance to bacterial wilt (Pseudomonas solanacearum). Cf. n° 3, 58-62.
- 71 - WILLIAMSON D.H. and WILKINSON J.F., 1958. The isolation and estimation of the Poly-bêta-hydroxy-butyrate Inclusions of Bacillus species. J. Gen. Microbiol. 19, 198-209.
- 72 - WINSTEAD N.N. and KELMAN A., 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to Pseudomonas solanacearum. Phytopath. 42, 628-634.
- 73 - WINSTEAD N.N. and KELMAN A., 1960. Resistance to bacterial wilt in eggplant in North Carolina. Plant Dis. Reprtr. 44, 432-434.